DER EINFLUSS VON HOMOLOGEN UND HETEROLOGEN ZELL-SUBSTITUTIONEN AUF DEN SERUM - INTERFERONSPIEGEL MILZEXSTIRPIERTER KANINCHEN NACH POLY IC - INDUKTION

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARIANNE NAIN
aus Marburg

1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

DER EINFLUSS VON HOMOLOGEN UND HETEROLOGEN ZELL-SUBSTITUTIONEN AUF DEN SERUM - INTERFERONSPIEGEL MILZEXSTIRPIERTER KANINCHEN NACH POLY IC - INDUKTION

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARIANNE NAIN

aus Marburg

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am : 3. April 1978
Tag der mündlichen Prüfung : 28. April 1978

Berichterstatter : Prof. Dr. E. Geyer
Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. Kohlhage
Prof. Dr. R. Siegert

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Historisches	1
1.2.	Induktoren der Interferon - Synthese	2
1.3.	Induktion und Synthese des Interferon	4
1.3.1.	Das Refraktärstadium	6
1.3.2.	Die Superinduktion	6
1.4.	Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus von Interferon	7
1.5.	Chemische und physiko - chemische Eigenschaften von Interferonen	9
1.6.	Biologische Eigenschaften der Interferone	12
1.7.	Die Synthese von Interferon im intakten Organismus	13
1.8.	Ziel der vorliegenden Arbeit	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1.	Versuchstiere	15
2.2.	Milzexstirpation	15
2.3.	Herstellung der Zellsuspensionen zur Interferon - Induktion in vitro	15
2.3.1.	Milzzell - Suspension	15
2.3.2.	Blutleukozyten - Suspension	16
2.4.	Verfahren der Zelltrennung	16
2.4.1.	Lymphozyten - Isolierung I	17
2.4.2.	Lymphozyten - Isolierung II	18
2.4.3.	Lymphozyten - Isolierung III	18
2.4.4.	Isolierung von T - Lymphozyten	20
2.5.	Induktion des Interferons	21
2.5.1.	Induktor	21
2.5.2.	Induktion im Kaninchen	21
2.5.3.	Induktion in Zellkulturen	22
2.6.	Austestung der Interferon-haltigen Proben	22
2.6.1.	Wachstums - und Erhaltungsmedien	22

Seite

2.6.1.1. Wachstumsmedium 22
2.6.1.2. Erhaltungsmedium 22
2.6.2. Züchtung des Test - Virus für den Plaque - Reduktionstest 23
2.6.3. Herstellung der Monolayer - Kulturen aus Kaninchennieren 23
2.6.4. Plaque - Reduktionstest 24
2.7. Qualitative Untersuchungen der Interferonproben 26
2.7.1. Isoelektrische Fokussierung 26
2.8. Sterilität 28

3. ERGEBNISSE 29

3.1. Erstellung einer Interferon - Eichkurve 29
3.2. Vergleichende Titerbestimmungen des PolyIC-induzierten Serum-Interferon von normalen, entmilzten und scheinoperierten Kaninchen. 32
3.3. Interferonspiegel in verschiedenen Organen des Kaninchens nach PolyIC - Induktion. 35
3.4. Übertragung von Milzzell - Suspensionen auf entmilzte Kaninchen (= homologe Substitution) 37
3.5. Milzzell - Transplantation von Meerschweinchen - Milzzellen auf entmilzte Kaninchen (= heterologe Substitution) 40
3.6. Milzzell - Transplantation von Mäuse - Milzzellen auf entmilzte Kaninchen (= heterologe Substitution) 44
3.7. Einfluß der Zellzahl auf die Substitution (Dosis - Wirkungs - Beziehung) 45
3.8. Zelltrennung von Milzleukozyten in Lymphozyten und Granulozyten 48
3.8.1. Trennung von Lymphozyten, Granulozyten und Erythrozyten im diskontinuierlichen Dichtegradienten (Doppelgradient) aus Ficoll - Hypaque (Ronpacon) 48

Seite

3.8.2. Trennung von Lymphozyten und Granulozyten mit dem Röntgenkontrastmittel " Uromiro " nach OTTO 50

3.8.3. Trennung von Lymphozyten und Granulozyten mit der Ficoll - Paque - Methode (Pharmacia, Uppsala) 51

3.8.4. Trennung von Meerschweinchen - Milzzellen nach den genannten 3 Methoden 52

3.9. Trennung von T - und B - Lymphozyten 53

3.10. Einfluß des Applikationsortes (i.v./i.p.) der Milzzell - Suspension auf die Substitution 54

3.11. Qualitative Untersuchungen der Serum - Interferonproben von normalen und entmilzten Kaninchen nach homologer und heterologer Substitution durch Milzzellen junger Kaninchen mittels Isoelektrischer Fokussierung 56

4. DISKUSSION 74

5. ZUSAMMENFASSUNG 83

6. LITERATURVERZEICHNIS 85

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0032

1. EINLEITUNG

1.1. Historisches

Vor mehr als 40 Jahren entdeckten HOSKINS und MAGRASSI (1935) die virale Interferenz, ein für die Pathogenese der Virusinfektionen wichtiges Phänomen. Es besteht darin, daß sich verschiedene Virusarten bei gleichzeitiger oder aufeinanderfolgender Infektion des gleichen Wirtes gegenseitig in ihrer Vermehrung beeinträchtigen (FINDLAY und McCALLUM, 1937). Die Interferenz tritt auch zwischen nicht verwandten Virusarten auf und wird nicht nur bei Mensch und Tier, sondern auch in Hühnerembryonen (W. und G. HENLE, 1943), Gewebsexplantaten (HUANG, 1943) und in Zellkulturen (LENETTE und KOPROWSKI, 1946) beobachtet. Man kann daraus entnehmen, daß sie sich auf zellulärer Ebene abspielt.

Für den Zustand der viralen Interferenz kommen verschiedene Mechanismen in Betracht : Das zuerst adsorbierte Virus blockiert die Rezeptoren der Zelloberfläche, sodaß ein nachfolgendes Virus nicht mehr haften kann. Es besteht auch die Möglichkeit, daß es sich um eine Konkurrenz um die zellulären Synthesewege handelt. Mit diesen Mechanismen, bei denen die Virusinterferenz direkt vermittelt wird, läßt sich jedoch nicht erklären, warum dieser Zustand auch in den, von der Virusinfektion nicht betroffenen Nachbarzellen eintreten kann. Die Ursache dieser Vermehrungshemmung wurde 1957 von ISAACS und LINDENMANN geklärt.

Sie adsorbierten zunächst inaktiviertes Influenzavirus an Membranstücke der Chorioallantois von Hühnerembryonen, die dann von nicht adsorbiertem Virus freigewaschen, in frisches Medium überführt und 6 - 24 Stunden bei 37° C inkubiert wurden. Sie entfernten dann die ursprünglichen Gewebestücke, ersetzten sie durch frische Membranstücke und inkubierten sie

im verbliebenen Medium für 18 - 24 Stunden bei 37° C. Bei nachfolgender Infektion dieser Zellkultur, die noch keinen Viruskontakt hatte, mit lebendem Influenzavirus, bestand eine deutliche Hemmung der Virusvermehrung. Diese Ergebnisse konnten nur so gedeutet werden, daß ein von den Wirtszellen gebildeter, löslicher Mediator den Zustand der Interferenz in ihren Nachbarzellen induziert hatte. Diese Mediatorsubstanz bezeichneten sie als Interferon.

Das Prinzip der viralen Interferenz wurde daraufhin als ein Zustand definiert, der durch ein interferierendes Virus hervorgerufen wird und durch eine teilweise oder vollständige unspezifische Resistenz der Wirtszellen gegen eine nachfolgende Superinfektion durch ein Zweitvirus charakterisiert ist. In der Folgezeit stellte sich heraus, daß Interferon oder ähnlich wirksame Substanzen in den Zellen nahezu aller Vertebraten als Antwort auf eine Virusinfektion entstehen.

1.2. Induktoren der Interferon - Synthese

Die meisten DNA - und RNA - Viren sind sowohl in vivo als auch in vitro zur Interferon - Induktion befähigt (TYRELL, 1959; HENLE et.al., 1959; WAGNER, 1960; HO et.al., 1964, 1966; DUBOVI, 1972; SMITH et. al., 1973; GAJDOSOVA et.al., 1973; TAKEHARA et.al., 1973; DIANZANI, 1974; ORLOVA, 1976). Einige dieser Viren wirken auch nach UV - oder Hitzeinaktivierung noch als Stimulatoren, z.B. Influenza -, Newcastle disease - oder Mumps - Virus (BURKE und ISAACS, 1958; HENLE et.al., 1959; CANTELL, 1961), Vaccinia - (GLASGOW und HABEL, 1962), Herpes simplex - (WADDEL, 1962) und Chikungunya - Virus (DIANZANI, 1974). Neben Viren sind auch mikrobielle Agentien zur Interferon - Stimulierung in der Lage : Bakterien (YOUNGNER et.al., 1964, 1965; DE SOMER et.al., 1966; BORECKY et.al., 1967; YOUNGNER et.al., 1974; RAMUZ et.al., 1974), bakterielle Endotoxine (HO, 1964;

STINEBRING, 1964; OH et.al., 1966; VILCEK et.al., 1966; GALABOV et.al., 1973), Rickettsien (HOPPS et.al., 1964; KAZAR, 1966), Mycoplasmen (ARMSTRONG et.al., 1966; STINEBRING, 1966; RINALDO et.al., 1973, 1974; COLE et.al., 1976) und Protozoen (RYTEL et. al., 1966; FRESHMAN et.al., 1966).

In neuerer Zeit wurden weitere, überwiegend synthetische Induktoren gefunden : z.B. Tilorone Hydrochlorid (ERMOLIEVA et.al., 1973; RHOADS et.al., 1973; GLAZ et.al., 1975), Acranil (GLAZ et.al., 1973), chemisch phophorylierte Polysaccharide, wie Amylopektin, Amylose, Dextran und Mannan (LEVY et. al., 1973; SUZUKI et.al., 1972, 1975), synthetische anionische Polymere, wie Pyran (SELLERS et.al., 1972), basische Farbstoffe, wie Toluidinblau, Methy - lenblau, Trypoflavin, Acridinorange (DIEDERICH et. al., 1973) und substituierte Pyrimidine (NICHOL et. al., 1976).

Nachdem es FIELD et.al. (1967) mit dem synthetischen, doppelsträngigen Polynukleotidkomplex Polyinosin - Polycytidylsäure (Poly IC) gelungen war, Interferon bei Mäusen zu stimulieren, begann eine angestrengte Suche nach weiteren Interferon - induzierenden Nukleinsäuren. Sie führte zur Entdeckung der doppelsträngigen Ribonukleinsäuren Statolon aus Penicillium stoloniferum (KLEINSCHMIDT et.al., 1964, 1965, 1967), Helenin aus Penicillium funiculosum (RYTEL et.al., 1966) und Lymphomycin, einem Anti - Tumor - Antibiotikum aus Streptomyces (SUZUKI et.al., 1974); auch Polyguanyl - Polycytidylsäure (AKSENOV et.al., 1973) und Polyadenyl - Polyuridylsäure (NOVOKHATSKY et.al., 1975) erwiesen sich als hochaktive Doppelstränge.

Die meisten Untersuchungen betrafen das im Tier aktivste Polynukleotid, Poly IC (ORINDA, 1972; FIELD et.al., 1972; TAZULAKHOVA et.al., 1973; STRINGFELLOW et.al., 1974; ORLOVA et.al., 1974; MATSUYAMA, 1974;

MOZES et.al., 1975). Seine Wirkung kann noch durch Zugabe des Polyanions DEAE - Dextran (SVEC, 1974; NOVOKHATSKY et.al., 1973, 1975), durch Komplexierung mit Carboxymethylcellulose (LEVY et.al., 1975) oder durch Thiolation (O'MALLEY et.al., 1975) erhöht werden, was im Hinblick auf seine klinische Anwendung bedeutungsvoll erschien.

1.3. Induktion und Synthese des Interferon

Die zur Zeit vertretene Vorstellung über die Induktion und Synthese des Interferonmoleküls basiert auf dem Modell von JACOB und MONOD (1961) für die genetische Regulation der Proteinsynthese bei Bakterien:

Danach sollen an dem Regulationsmechanismus für die Interferonsynthese mindestens zwei Operon - Einheiten beteiligt sein. Das Regulatorgen für Interferon synthetisiert in der Zelle ständig einen Repressor, der die Ablesung des Interferon - Cistrons verhindert. Die Aktivierung der reprimierten Interferon - Gene erfolgt durch einen Interferon - Induktor (Effektor), der auf irgendeine, noch ungeklärte Weise mit dem Repressormolekül reagiert, wodurch dieses abgebaut bzw. entfernt wird (VILCEK, 1969). Damit kann die Transkription der Interferon - Gene ablaufen : eine mRNA wird synthetisiert und zum Interferonmolekül translatiert. Man stellt sich vor, daß die Interferonmoleküle - nachdem sie eine bestimmte Konzentration erreicht haben - zu Oligomeren aggregieren, wodurch die Konfiguration der individuellen Monomere verändert wird (DAWSON et.al., 1968; ADAMS et.al., 1969; KLOTZ et.al., 1970). Die Aggregation der Untereinheiten soll eine Vergrößerung der reaktiven Oberfläche zur Folge haben, die das Interferonmolekül befähigt, mit dem Interferonrepressor zu reagieren. Dieser Komplex aus Oligomer und Repressor wirkt als Super - Repressor und führt zu einer stabilen Repression des Interferon - Cistrons.

Eine Reihe von Versuchen unterstützte dieses Modell der Regulation des Interferonmoleküls :
BURKE (1966) behandelte Zellen mit Aktinomycin vor und verhinderte damit das Erscheinen neu synthetisierter Interferonmoleküle, was darauf hindeutet, daß eine DNA - abhängige RNA - Synthese sowie eine intakte zelluläre Proteinsynthese für die Bildung von Interferon bedeutungsvoll sind.
CASSINGENA et.al. (1971) bewiesen die genetische Kontrolle der Interferon - Synthese, indem sie die spezifischen Gene für die Interferonproduktion lokalisierten. DE MAEYER et.al. (1972) isolierten aktive mRNA aus Poly IC - induzierten Mäusezellen und konnten nach ihrer Übertragung auf ein heterologes Affenzellsystem eine Maus - Interferonsynthese in den Rezeptorzellen induzieren. Selbst VERO - Zellen, eine permanente Zell - Linie von afrikanischen grünen Meerkatzen - Nieren, die nicht zur Interferonsynthese befähigt sind, produzierten nach Inkubation mit der entsprechenden mRNA Interferon mit der Artspezifität des mRNA - Spender - Systems. PESTKA et.al. (1975) synthetisierten mit einer mRNA aus Poly IC - induzierten menschlichen Fibroblasten im zellfreien Extrakt aus Mauszellen de novo biologisch aktives Human - Interferon.

Das Interferonsystem bzw. die Interferoninduktion zeigen zwei spezielle, bisher noch nicht geklärte Phänomene, für die das Induktionsmodell eine Deutungsmöglichkeit bietet : das Refraktärstadium und die Superinduktion.
Induziert man Zellkulturen (CANTELL et.al., 1963; BURKE et.al., 1965) oder Versuchstiere (HO et.al., 1965; YOUNGNER et.al., 1965) wiederholt zur Interferonproduktion, so tritt ein Toleranz - oder Refraktärstadium ein : ein Zustand, in dem die Zellen nur noch vermindert oder garnicht mehr auf den Induktor antworten. Unter ganz bestimmten Induktionsbedingungen kann jedoch auch eine Superinduktion auftreten.

1.3.1. Das Refraktärstadium

Behandelt man L - Zellen mit inaktiviertem Newcastle Disease Virus (NDV), so ist die Interferon - Ausschüttung nach 24 Stunden abgeschlossen. Nach wiederholter Behandlung der Zellen mit NDV wird kein Interferon mehr freigesetzt (CANTELL et.al., 1963). HO et.al. (1965) fanden im Serum toleranter Tiere einen humoralen Faktor, der die induzierende Wirkung von Endotoxin aufhob. Arbeiten von YOUNGNER et.al. (1965), BILLIAU (1970), BUCKLER et.al. (1971), BREINIG et. al. (1975) und VILCEK (1976) unterstützten diese Ergebnisse. BORDEN (1975) konnte mittels Gelchromatographie in Interferon - Präparaten zwei verschiedene Proteine unterscheiden, wovon eines die Toleranz gegenüber einer zweiten Interferon - Induktion induziert (' refractoriness inducing protein ' = RIP), während das andere für die Entstehung des antiviralen Status verantwortlich ist. STRINGFELLOW (1975) konnte einige Eigenschaften dieses Serumfaktors beschreiben. Im Refraktärstadium scheint der Komplex aus Interferon - Polymer und - Repressor, also der Super - Repressor, so fest an die DNA gebunden zu sein, daß es dem Induktormolekül nicht mehr möglich ist, mit dem Repressor zu reagieren. Erst, wenn dieser Super - Repressor durch den Zellmetabolismus ab - bzw. umgebaut wird, ist der freigewordene Repressor wieder in der Lage, mit einem neuen Induktormolekül zu reagieren.

1.3.2. Die Superinduktion

HO et.al. (1970, 1972) konnten durch gezielte Gaben von Stoffwechsel - Inhibitoren wie Actinomycin D oder Cycloheximid die Transkription des endogenen Repressors selektiv hemmen und damit infolge fehlender Repression bzw. Regulation, eine deutliche Akkumulation von Interferon in der Zelle erreichen. Auch SEGHAL

(1975, 1976) gelang es durch Behandlung mit 5,6 - Dichloro-1-ß-D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB), den Repressor auszuschalten und daraufhin eine 4 Tage andauernde Interferonproduktion zu induzieren.

1.4. Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus von Interferon

Bevor ein Virus innerhalb einer Wirtszelle vermehrt werden kann, müssen verschiedene Vorgänge ablaufen : Nach Adsorption und Penetration in die Wirtszelle erfolgt das sogenannte ' uncoating '. Die Virusnukleinsäure wird aus dem Proteincapsid entlassen und verbindet sich mit den Ribosomen der Wirtszelle zu einem Polysom, welches zunächst Enzyme für die Replikation der viralen Nukleinsäure und anschließend virales Strukturprotein synthetisiert. Die virusspezifischen Proteine umhüllen die neugebildeten Nukleinsäuren und lassen damit ein neues Virion entstehen.

Eine direkt inaktivierende Wirkung von Interferon auf das komplette Viruspartikel konnte ebenso ausgeschlossen werden (HO et.al., 1959; WAGNER, 1961), wie eine inaktivierende Wirkung auf die virale Nukleinsäure (MAYER et.al., 1961). Interferon kann weder die Adsorption noch die Penetration von Viren verhindern (ISAACS et.al., 1959; DE SOMER et.al., 1962). Die Frage, ob der Uncoating - Prozeß gehemmt wird, ist noch offen; zumindest scheint eine solche Hemmung für einige DNA - Viren zuzutreffen (MAGEE et.al., 1968).

Die antivirale Wirkung von Interferon wird also nicht auf das Virus selbst, sondern auf die potentielle Wirtszelle ausgeübt. Dazu dringt Interferon nicht in die Effektorzelle ein, sondern es genügt ein Kontakt mit der Zellmembran, um einen zelleigenen Mechanismus in Gang zu setzen, der zur Bildung eines hypothetischen antiviralen Proteins (AVP) führt.

Interferon initiiert den antiviralen Status einer Zelle also durch Interaktionen mit Zellrezeptoren, die denen für Choleratoxin und Thyrotropin ähnlich sind und bei denen es sich möglicherweise um Gangliosside oder Gangliosid-ähnliche Strukturen mit einem Oligosaccharidanteil handelt (BESANCON und ANKEL, 1974, 1976; VENGRIS et.al., 1976).

Der Wirkungsmechanismus des antiviralen Proteins könnte auf einer Hemmung der frühen viralen Syntheseprozeße beruhen. Tatsächlich wird in Interferon - behandelten Zellen sowohl bei DNA - als auch bei RNA - Viren die Translation der virusspezifischen mRNA in frühe Proteine verhindert (COCITO et.al., 1962; TAYLOR, 1965; JOKLIK et.al., 1966; SONNABEND et.al., 1967). Aus diesem Grund bezeichnet man das antivirale Protein auch als Translations - inhibierendes Protein (TIP).

SONNABEND et.al. (1967) wiesen in Virus - infizierten, Interferon - behandelten Zellen eine quantitative Verringerung der DNA - Polymerase nach, was für eine Synthesehemmung der viralen DNA - abhängigen RNA - Polymerase spricht. Hinweise, die für eine Konfigurationsänderung der Ribosomen durch das antivirale Protein sprachen, fanden MARCUS und SALB (1966, 1968). Sie beobachteten in Interferon - behandelten Zellen veränderte Ribosomen, die virale mRNA zwar binden, jedoch nicht translatieren konnten. JOKLIK und MERIGAN (1966) demonstrierten eine reduzierte Fähigkeit der viralen RNA, sich mit den Wirtsribosomen zu Polysomen zu verbinden. Auch CARTER und LEVY (1967, 1968) wiesen eine verminderte Affinität der Interferon - behandelten Zellribosomen für virale RNA nach. Demgegenüber fanden KERR et.al. (1970) keinerlei Anhaltspunkte für eine Ribosomenmodifikation in Interferon - behandelten Zellen, und auch GUGGENHEIM et.al. (1969) äußerten die Vermutung, daß Interferon nicht über eine Regulation an den

Ribosomen zur Wirkung kommt. 1971 konnten MARCUS und SALB an Vesicular Stomatitis Virus (VSV) - infizierten Zellen eindeutig nachweisen, daß durch die Interferon - Behandlung die Transkription der viralen mRNA gehemmt wird. LEVY et.al. (1973) und SAMUEL et.al. (1974) lieferten Hinweise dafür, daß eine Interferon - Behandlung der Zellen zu einer Veränderung der viralen RNA führt, und zwar in der Weise, daß die Zellen sie von einer zellulären RNA unterscheiden können.
Sollte Interferon tatsächlich die Synthese der viralen Polymerasen hemmen, so scheint sein Wirkungsmechanismus darin zu bestehen, daß ein sehr früher viraler Syntheseschritt gehemmt, und dem Virus damit keine Gelegenheit zur Etablierung geboten wird.
Die Abwehr einer Virusinfektion durch Interferon ist eine sinnvolle Ergänzung der Abwehr durch das Immunsystem. Die Virus - infizierte Zelle und von ihr freigesetzte Viruspartikel rufen eine Immunantwort hervor, die jedoch zu spät erfolgt, um ein Organ vor der Schädigung durch die Virusinfektion zu bewahren. Eine frühere und damit effektivere Abwehr könnte durch Interferon erreicht werden, indem es, von der ersten infizierten Zelle gebildet, die Nachbarzellen oder auf humoralem Wege auch weiter entfernte Zellen vor der fortschreitenden Infektion schützt (FINTER, 1973).

1.5. Chemische und physiko - chemische Eigenschaften von Interferonen

UV - Spektren von gereinigtem Hühner - Interferon zeigen eine Adsorption, die auf ein Protein mit geringen Spuren an Kohlenhydraten hindeutet. LAMPSON et.al. (1963) und auch DORNER et.al. (1973) vermuten, daß Kaninchen - Interferon ein Glykoproteid mit terminaler Oligosaccharid - Sequenz : Sialinsäure - Galaktose darstellt. Die Aminosäuren - Analyse zeigte Arginin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan, sowie Spuren von Asparagin - und Glutaminsäure (FANTES, 1966).

Interferon wurde damit als ein Proteid charakterisiert, welches auf proteolytische Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin empfindlich reagiert (ISAACS et.al., 1957; LAMPSON et.al., 1963), von Nukleasen, Lipasen und Amylasen jedoch nicht beeinflußt wird (ISAACS et.al., 1957; LOCKART, 1963).

Interferone weisen eine relativ hohe Hitzestabilität auf, wobei selbst eine Erwärmung auf 56° C - 60° C noch keinen Aktivitätsverlust zur Folge hat. Innerhalb eines Testsystems können je nach Art des Induktors Interferone von unterschiedlicher Hitzestabilität auftreten (HO, 1964; WHEELOCK, 1965; SMITH et. al., 1967). Auch zeigten hoch - und niedermolekulare Interferonkomponenten des Kaninchenserums, die auf ein und denselben Induktor hin gebildet wurden, eine unterschiedliche Hitzeresistenz (KADRI et.al., 1969; KOHLHAGE et.al., 1969).

Virus - induzierte Interferone sind über einen pH - Bereich von 2 - 10 stabil (LINDENMANN et.al., 1957; LAMPSON et.al., 1965), während nach Endotoxin - Induktion eine Stabilität erst oberhalb pH 3,5 besteht.

Ungereinigte Interferon - Präparate sind relativ stabil gegenüber UV - Bestrahlung (ZEMLA und VILCEK, 1961); gereinigte Interferone werden jedoch zunehmend empfindlicher gegenüber einer derartigen Behandlung (MERIGAN et.al., 1965).

Eine Harnstoffbehandlung wirkt auf Interferone verschiedener Herkunft unterschiedlich (FANTES, 1966; MERIGAN et.al., 1965; HALLUM et.al., 1965). Nach KADRI et.al. (1969) und KOHLHAGE et.al. (1969) wird die nach NDV - Induktion aus Kaninchenserum erhaltene hochmolekulare Interferonkomponente durch 4 M Harnstoff inaktiviert, während die Aktivität der niedermolekularen Komponente erhalten bleibt.

Interferone werden durch eine Zentrifugation bei 100.000 x g für 1 - 2 Stunden nicht sedimentiert

(ISAACS et.al., 1957; BARON et.al., 1963) und passieren auch keine Dialysemembran (ISAACS et.al., 1957; LAMPSON et.al., 1963).

Die ersten Molekulargewichtsbestimmungen von PORTERFIELD et.al. (1960) und BURKE (1961) ergaben ein Molekulargewicht im Bereich von 15.000 - 100.000. Spätere Untersuchungen mit Sephadex G - 100 - Säulen führten bei Interferon aus Hühnerembryonen zu Werten von 20.000 - 40.000 (LAMPSON et.al., 1963; KREUZ et.al., 1963; ROTEM, 1963; JUNGWIRTH et.al., 1964). LAMPSON et.al. (1963) konnten weiterhin feststellen, daß die Aktivität von Hühnerallantois - Interferon aus zwei Komponenten mit Molekulargewichten von 38.000 und 50.000 besteht. KE et.al. (1966) und KOHLHAGE et.al. (1969) fanden auch bei Kaninchen nach Virus-Induktion zwei Interferonkomponenten mit unterschiedlichen Molgewichten. TABORSKY (1974) bestätigte diese Befunde und beschrieb zwei Komponenten mit Molgewichten von 100.000 und 50.000 - 55.000. YOUNGNER (1968) und TABORSKY et.al. (1970) zeigten, daß verschiedene Induktoren bei einer einzigen Spezies unterschiedliche Interferone stimulieren können, während ein und derselbe Induktor bei verschiedenen Zellen heterogene Interferonkomponenten aktivieren kann (MERIGAN et.al., 1965; FALCOFF et.al., 1966; LAMPSON et.al., 1966). PITHA et.al. (1973) unterstützten die Hypothese, daß die hochmolekulare Form ein diskretes Interferon - Aggregat oder - Oligomer darstellt, welches sich aus einzelnen Untereinheiten zusammensetzt.

Die Angaben über die isoelektrischen Punkte der Interferone weichen bemerkenswert voneinander ab (MERIGAN et.al., 1965; BODO und JUNGWIRTH, 1964; LAMPSON et.al., 1965; FANTES, 1967). SVENSSON (1961) stellte fest, daß die Interferonaktivität aus mehreren Komponenten mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten besteht und auch KOHLHAGE et.al. (1969)

sowie BILLIAU et.al. (1970) konnten eine große physikalische Heterogenität der Virus - induzierten Interferone im Kaninchenserum nachweisen. Nach TABORSKY (1974) zeigt das isoelektrische Profil von Kaninchenserum 7 Gipfel; die deutlichsten bei pH 4.4, 4.8 und 6.0.

1.6. Biologische Eigenschaften der Interferone

Eine wichtige Eigenschaft der Interferone ist die Unspezifität ihrer antiviralen Wirkung. In den verschiedenartigsten Zellen wird durch Interferon die Vermehrung zahlreicher DNA - und RNA - Viren gehemmt (HO, 1962). Darüberhinaus erfaßt sein Wirkungsspektrum auch Bakterien, Rickettsien und Protozoen (REMINGTON und MERIGAN, 1968; MERIGAN, 1969; WHEELOCK, 1969).

1959 beobachtete TYRELL, daß Interferone im homologen Zellsystem in der Regel weitaus besser zur Wirkung kommen als in heterologen Zellen; auch für Hühner- und Enteninterferone konnte dieses Phänomen der Spezies - Spezifität bestätigt werden (WAGNER, 1960). Die ersten abweichenden Befunde lieferten ISAACS et. al. (1961) und BUCKNALL (1967). Sie fanden Affen-Interferon auch in heterologen Zellen ebenso, wenn nicht noch wirkungsvoller als in homologen Zellen. Menschliches Leukozyten - Interferon schützt auch Rinderembryo -, Kaninchen -, Schweine - und permanente Mäusezellen besser als menschliche Fibroblasten (GRESSER, 1974; BORECKY, 1974; PAUKER, 1975; DESMYTER, 1976). Nicht - Primaten - Interferon besitzt jedoch keine Aktivität für Primatenzellen, was als ' one-way crossing of the species barrier ' bezeichnet wird. NAGANO et.al. (1975) stellten fest, daß spätes Maus-Interferon (9 Stunden nach Induktion) in allen getesteten Säugerzellen aktiv war. Frühes Interferon (2 Stunden nach Induktion) war zwar in Maus -, Hamster - und Hühnerzellen, jedoch nicht in Kaninchen-

und Humanzellen wirksam. Die Genus - spezifische Aktivität von Interferon scheint somit eine mögliche, nicht jedoch eine notwendige Eigenschaft zu sein.

1.7. Die Synthese von Interferon im intakten Organismus

KONO und HO (1965) infizierten Zellsuspensionen von verschiedenen Organen des Kaninchens mit Sindbis Virus und fanden die höchsten Interferontiter in Milz -, Leber - und Leukozytenextrakten. Die Ergebnisse ließen eine Beteiligung des RES an der Interferon - Synthese vermuten. Die gleichen Autoren konnten zeigen, daß eine vorherige Blockade des RES durch Thorotrast die Interferontiter beträchtlich reduzierte. Weitere Untersuchungen erstreckten sich insbesondere auf Lymphozyten und Makrophagen (LACKOVIC und BORECKY, 1965; GLASGOW, 1965; STRANDER und CANTELL, 1966; SMITH und WAGNER, 1967; KONO, 1967) ohne daß der genaue Zelltyp der Interferon - produzierenden Zellen zweifelsfrei ermittelt werden konnte. Nach den bisherigen Befunden scheint die Milz einen Hauptsyntheseort für Interferon darzustellen (KONO und HO, 1965; FRUITSTONE, 1966). Einige Autoren schränken jedoch ein, daß die Milz für eine Endotoxin - oder Poly IC - induzierte Interferon - Synthese eine größere Bedeutung hat als für eine Virus - induzierte Produktion (DE SOMER und BILLIAU, 1966; BORECKY und LACKOVIC, 1967; ITO et.al., 1971).
Stimuliert man splenektomierte Mäuse am dritten Tag nach der Operation mit Endotoxin, so produzieren sie kein zirkulierendes Interferon; erfolgt die Stimulation jedoch erst sechs Wochen später, so bilden die Tiere ebensoviel Interferon wie scheinoperierte Kontrollmäuse (ITO et.al., 1971; MAEHARA et.al., 1972). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Milzexstirpation bei Mäusen nach Poly IC - Induktion einen zeitlich begrenzten Verlust an Serum - Interferon bewirkt.

Demgegenüber beobachteten HELLMANN und KOHLHAGE (1973), daß Kaninchen bei einer NDV - induzierten Interferon - Synthese auch nach Splenektomie die gleichen Serum - Titerwerte wie normale Kontroll - Kaninchen entwickelten. 1973 wiesen ITO et.al. auf die Fähigkeit von i.p. applizierten Milzzellen hin, die verlorengegangene Produktionskapazität der entmilzten Mäuse zu kompensieren. Auch in thymuslosen Mäusen läßt sich durch Milzzellgaben der Serum - Interferontiter anheben (PANTELOURIS et.al., 1976).

1.8. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Untersuchungen galten der Frage, ob auch bei splenektomierten Kaninchen die verlorengegangene Fähigkeit zur Interferonbildung nach Poly IC - Induktion durch homologe sowie heterologe Substitution von Milzzellen kompensiert werden kann.
Durch eine Fraktionierung der Milzzell - Suspensionen mit Hilfe verschiedener Trennungsmethoden sollte ferner geklärt werden, welcher Zelltyp für die Interferonproduktion verantwortlich ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Kaninchen beiderlei Geschlechts aus gleicher Zucht (Kreuzung " Widder " X " Deutscher Riese ") im Gewicht von 2,0 - 2,5 kg verwendet.

2.2. Milzexstirpation

Die Kaninchen wurden in i.v. - Nembutalnarkose (0,5 ml Deutobarbital - Natrium / kg Körpergewicht; Deutsche Abbot GmbH, Ingelheim) auf einem Operationstisch fixiert. Die Desinfektion der rasierten Bauchhaut erfolgte mit 70 % - igem Äthanol. Nach Eröffnung der Bauchhöhle durch Haut - und Muskelschnitt wurden die Milzgefäße unterbunden, das Organ entfernt, sowie das Peritoneum und die einzelnen Muskellagen schichtweise durch Knopfnähte verschlossen. Ein Antibiotikum - Puder (Nebacetin - Puder, Byk - Gulden, Lomberg), der zwischen Muskulatur und Haut gestreut wurde, sollte einer möglichen Infektion vorbeugen. Nochmaliges Besprühen der geschlossenen Bauchhaut mit antibiotikahaltiger Kunstharzlösung (Nobecutan - Spray, Bastian - Werk, München) schützte die Wunde von außen vor Kontaminationen.

2.3. Herstellung der Zellsuspensionen zur Interferon - Induktion in vitro

2.3.1. Milzzell - Suspensionen

Die Herstellung von Milzzell - Suspensionen erfolgte nach einer von FIELD et.al. (1968) beschriebenen Methode. Die Milzen von 4 - 6 Wochen alten Kaninchen wurden in Nembutalnarkose entnommen und nach Entfernung der Bindegewebskapsel mit sterilen Pinzetten in kaltem NaCl - Phosphat - Puffer zerzupft. Die ge -

wonnene Zellsuspension kam in einen Standzylinder, um größere Zellaggregate sedimentieren zu lassen. Nach ca. 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und 10 Minuten bei 134 x g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem NaCl - Phosphat - Puffer wurden die Erythrozyten durch Zugabe von Humanserum (1:1) lysiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Waschen sind die Milzzellen in Eagles Basal Medium (siehe Kap. 2.6.1.2.) suspendiert worden. Die Ausbeute pro Milz betrug 8×10^8 - 2×10^9 Zellen. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer NEUBAUER-Zählkammer.
Mit Leber - und Lungengewebe wurde in gleicher Weise verfahren.

2.3.2. Blutleukozyten - Suspension

2 - 3 kg schwere Kaninchen wurden in Nembutalnarkose entblutet, wobei zur Vermeidung einer Gerinnung 20 mg Heparin (Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Dänemark) / 100 ml Blut zugesetzt wurden. 300 ml Vollblut wurden jeweils mit 150 ml einer 3 % - igen Dextranlösung (Dextran T 500, Pharmacia, Uppsala) versetzt und ca. 45 Minuten, bis zur Erythrozytensedimentation, bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Der leukozytenreiche Überstand wurde abgesaugt und nach Zentrifugation (5 Minuten bei 143 x g) in frischem Kaninchenplasma suspendiert.

2.4. Verfahren der Zelltrennung

Die Zell - Differenzierung der Milzzell - Suspensionen oder des Blutes war notwendig, um die Interferon - Syntheserate der einzelnen Zellarten individuell prüfen zu können.

2.4.1. Lymphozyten - Isolierung (I)

Sie erfolgte nach der Methode von OTTO (1970) in folgender Weise :
Uromiro 300 (Dr. Franz Köhler Chemie, Alsbach), eine 65 % - ige wässrige Lösung des Methylglukamin - Salzes der 3-Acetylamino-methyl-5-acetylamino-2,4,6,-trijodbenzoesäure (Jodamid), mit einem Jodgehalt von 300 mg / ml wurde mit 5 % NaOH bis zu einem pH von 7,0 neutralisiert und durch Zugabe von destilliertem Wasser auf das spezifische Gewicht von 1,076 eingestellt. Die zu trennende Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenglas auf die neutrale Jodamidlösung überschichtet (20 ml : 20 ml) und 30 Minuten bei 525 x g zentrifugiert : Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten, während sich die Lymphozyten als deutlich sichtbarer, weißer Ring in der Trennschicht zwischen Puffer und Jodamidlösung anreicherten. Sie wurden mit einer Pasteur - Pipette abgehoben und in NaCl-Phosphat - Puffer gewaschen. Die Präparation war völlig frei von Granulozyten. Die Kontamination mit Erythrozyten lag bei der ersten Überschichtung bei 3 %; durch eine erneute Überschichtung wurden auch die restlichen Erythrozyten eliminiert, sodaß eine reine Lymphozytenpräparation vorlag. Nach Einwirkung von Jodamid bzw. " Uromiro - 300 " auf Lymphozyten konnte man lichtoptisch keine Zellschädigung feststellen. Die Trypanblau - Vitalitätsprüfung ergab 2 - 4 % gefärbte Zellen. Die Färbung der Zellen zur Differenzierung erfolgte als sogenannte " panoptische Färbung " nach PAPPENHEIM :
Das lufttrockene Präparat wurde 3 Minuten mit May - Grünwald - Lösung fixiert und nach Zusatz der gleichen Menge neutralisierten, destillierten Wassers noch 1 Minute gefärbt. Hierauf wurde die Lösung abgegossen und das Präparat mit verdünnter wässriger Giemsa - Lösung (10 Tropfen auf 10 ml) 15 Minuten gefärbt und nach dem Spülen luftgetrocknet.

2.4.2. Lymphozyten - Isolierung (II)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verwendung von zwei flüssigen Phasen :

1. die zu trennende Zellsuspension in NaCl-Phophat-Puffer und
2. das Trennungsmedium Ficoll - Paque (Pharmacia, Uppsala), dem die Probe aufgelagert wird.

Ficoll - Paque ist eine wässrige Lösung der Dichte 1.077 $\pm$ 0.001 g / ml, die 5,7 g Ficoll 400 und 9 g Natriumtrizoat / 100 ml enthält.

Das Ergebnis der Trennung beruht auch hierbei auf den unterschiedlichen Sedimentationsraten der Zellen in den zwei flüssigen Phasen. Ficoll 400 aggregiert bei diesem Vorgang die Erythrozyten, was ihre Sedimentationsrate erhöht und sie von den anderen Komponenten der Zellsuspension trennt. Ebenso werden die relativ großen Granulozyten auf Grund ihrer hohen Dichte in Ficoll - Paque durch Zentrifugation (400 x g für 35 Minuten) abgetrennt. Die Aggregation der Erythrozyten wächst mit zunehmender Temperatur, wobei jedoch die Ausbeute an Lymphozyten abnimmt. Eine Temperatur von 18 - 20° C ergibt eine optimale Ausbeute.

2.4.3. Lymphozyten - Isolierung (III)

Ein - Stufen - Trennung von Erythrozyten, Granulozyten und mononukleären Leukozyten in einem diskontinuierlichen Dichte - Gradienten von Ficoll - Hypaque (Doppelgradienten - Trennung) nach ENGLISH und ANDERSEN (1974)

Die Trennung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines diskontinuierlichen Gradienten, bestehend aus zwei Ficoll - Hypaque - Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Hypaque (= Natrium - Diatrizoat).
Das obere Trennmedium (Lösung I) wird nach THORSBY (1967) hergestellt und enthält 10 Teile 33,9 %

Hypaque + 24 Teile 9 % Ficoll (Pharmacia,Uppsala). Das spezifische Gewicht dieser Lösung liegt bei 1,077 g / ml (25° C). Die Lösung I wird einer Lösung II überschichtet, die aus 10 Teilen 50 % Hypaque und 20 Teilen 9 % Ficoll besteht und ein spezifisches Gewicht von 1,119 g / ml hat.
20 ml Lösung I werden über 20 ml Lösung II in silikonisierte Glas - oder Plastikröhrchen (Granulozyten sind glasadhärent) gegeben und mit 10 - 20 ml der zu trennenden Zellsuspension überschichtet. Nach Zentrifugation bei 800 x g für 20 Minuten bei 25° C sind drei exakt definierte Zellschichten zu beobachten :

1. Die Interphase zwischen Zellpuffer (Eagles Basal Medium) und Lösung I enthält die mononukleären Zellen (80 - 90 %, mit einer Verunreinigungsrate von ca. 5 % Granulozyten und Monozyten).
2. Die Interphase zwischen Lösung I und Lösung II enthält die polymorphkernigen Leukozyten bzw. Granulozyten (95 - 98 %).
3. Das Sediment enthält die Erythrozyten.

Die isolierten Leukozyten wurden dreimal mit NaCl - Phosphat - Puffer gewaschen und nach der beschriebenen Methode zur Interferonsynthese stimuliert (siehe Kap. 2.5.3.).
Die Trypanblau - Vitalitätsprüfung ergab weniger als 1 % gefärbte Zellen. Anstelle von Hypaque wurde in den geschilderten Versuchen das Röntgen- Kontrastmittel Ronpacon 75 % (= Isopaque, Cilag-Chemie, Alsbach) verwendet.
Für die Differenzierung wurden die Zellen wiederum nach PAPPENHEIM gefärbt.
Der Vorteil der geschilderten Methode gegenüber anderen liegt darin, daß hierbei keinerlei Probleme durch Zellverklumpungen entstehen, was auf die geringe Viskosität der Ficoll - Ronpacon - Lösungen zurückzuführen ist. Aus dem gleichen Grund können auch die Zellen jeder Phase sehr leicht zurückgewonnen werden.

2.4.4. Isolierung von T - Lymphozyten

Sie erfolgte nach der Methode von JULIUS et.al. (1973) über Nylonwolle - Säulen aus LP 1 Leuko Pak Leukozyten Filter (Fenwal Laboratories Morton Grove, Illinois). Für die Versuche in vivo konnte die Nylonwolle ohne weitere Behandlung verwendet werden, für die in vitro Versuche mußte sie jedoch eine Woche lang in Aqua dest. gewaschen werden, um toxische Bestandteile zu entfernen.
Ungefähr 0,6 g - Aliquots der Nylonwolle wurden bis zur 6 ml - Markierung in eine 10 ml Plastikspritze (Braun, Melsungen) gepackt und autoklaviert. Die sterile Säule wurde nachfolgend mit 20 ml Eagles Basal Medium (siehe Kap. 2.6.1.2.) + 5 % hitzeinaktiviertem Kälberserum gespült, von überschüssigem Medium befreit und vor dem Beladen mit Zellen 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Die durch Trennung mit dem Doppelgradienten erhaltene Lymphozytenfraktion (1 - 1,5 x 10^8 Zellen) wurde in einem Volumen von 2 ml auf die Säule aufgetragen und mit 0,5 - 1,0 ml der auf 37° C vorgewärmten Hanks - Lösung (HANKS, 1948) in die Nylonwolle gewaschen. Daraufhin wurde die Säule erneut 45 Minuten bei 37° C mit den Zellen inkubiert und dann mit warmem Medium eluiert. Die ersten 25 ml wurden gesammelt und bei 290 x g für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert.

Mit dieser einfachen, reproduzierbaren Methode können Immunglobulin - tragende Zellen aus Suspensionen von Milz - und Lymphknotenzellen mit hoher T - Zell - Ausbeute (50 - 90 %) eliminiert werden. Eine einzige Adsorption an die Nylonwolle - Säule führt nach JULIUS et.al. (1973) zu einer Milzzellkultur, die 85 - 90 % T - Zellen, weniger als 5 % Ig - tragende Zellen (= B - Zellen) und ungefähr 10 % nicht identifizierbare Zellen enthält.
Die beschriebene Methode ist damit nicht für eine selektive Trennung von T - und B - Zellen geeignet,

sondern sie ermöglicht vielmehr eine schnell durchführbare Präparation funktioneller T - Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten.

2.5. Induktion des Interferon

2.5.1. Induktor

Als Interferon - Induktor wurde das anionische Copolymer " Poly IC " verwendet. Dieses synthetische Polyanion stellt einen Komplex aus gereinigten, hochmolekularen, homopolymeren Einzelsträngen von Polyinosin - Polycytidylsäure im Verhältnis 1 : 1 dar (Boehringer, Mannheim).

2.5.2. Induktion im Kaninchen

Das Maximum des Serum - Interferonspiegels fällt nach SIEGERT et.al. (1967) mit dem Maximum der Temperaturkurve zusammen, das 2 - 2,5 Stunden nach Poly IC - Injektion zu erwarten ist. Aus diesem Grund wurde bei den Kaninchen während der Induktion der Temperaturverlauf registriert. Die Kaninchen wurden in Drahtgestellen fixiert und über eine Rektalsonde mit einem thermoelektrischen Registriergerät (Hartmann & Braun, Frankfurt) verbunden. Nach Einstellung eines konstanten Temperaturwertes (ca 1 Stunde) erhielten die Tiere 200 µg Poly IC / kg Körpergewicht (gelöst in 5 ml NaCl - Phosphat - Puffer) intra - venös injiziert. Im Fiebermaximum wurden die Tiere in Nembutalnarkose (0,4 ml Deutobarbital - Natrium / kg Körpergewicht; Deutsche Abbot GmbH, Ingelheim) durch Herzpunktion steril entblutet. Das in sterilen Standzylindern aufgefangene Blut (etwa 70 ml / Tier) stand für eine Stunde bei Zimmertemperatur und nach Ablösung des Blutkuchens für weitere 24 Stunden bei 4° C. Das Serum wurde abgezogen, 15 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert, ampulliert und bei - 20° C bis zur Austestung gelagert.

2.5.3. Induktion in Zellkulturen

Die Zellsuspensionen (1,5 - 2,0 x 10^8 Zellen / 20 ml Eagles Basal Medium (siehe Kap. 2.6.1.2.)) erhielten zunächst 250 µg DEAE - Dextran (Pharmacia, Uppsala), 5 Minuten später 500 µg Poly IC und wurden 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten bei 134 x g) wurden die Zellen dreimal mit Eagles Basal Medium gewaschen und mit 20 ml frischem Medium weitere 3 Stunden bei 37° C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (20 Minuten bei 2800 x g), der Überstand abgezogen, ampulliert und bei - 20° C bis zur Austestung aufbewahrt.

2.6. Austestung der Interferon-haltigen Proben

2.6.1. Wachstums - und Erhaltungsmedien

2.6.1.1. Wachstumsmedium

Das Wachstumsmedium bestand aus einer Laktalbumin - Hydrolysat - Nährlösung (LAHN - Medium) auf der Grundlage einer Hanks - Lösung (HANKS, 1948). Sie wurde mit einem Zusatz von 5 % Laktalbumin - Hydrolysat (Nutritional Biochemicals Co., Cleveland, Ohio) und 10 % Kälberserum für die Kaninchennieren - Zellkulturen (siehe Kap. 2.6.3.) verwendet.

2.6.1.2. Erhaltungsmedium

Als Erhaltungsmedium wurde Eagles Basal Medium (EBM), modifiziert nach EAGLE (1959), mit einem Zusatz von 200 E Penicillin / ml (Grünenthal, Stolberg) und 100 µg Streptomycin / ml (Bayer, Leverkusen) benutzt. Der pH - Wert wurde mit $NaHCO_3$ auf 7,2 eingestellt.

2.6.2. Züchtung des Test - Virus für den Plaque - Reduktionstest

Die Vermehrung des im Plaque - Reduktionstest verwendeten Test - Virus (Vesicular Stomatitis Virus = VSV) erfolgte in ROUX - Flaschen auf Monolayer - Zellkulturen von Kaninchennieren (HUANG et.al., 1966; WAGNER et.al., 1968 ; KE et.al., 1969). Jede ROUX - Flasche, die etwa 2 x 10^7 Zellen enthielt, wurde mit ca 50 ml EBM ohne Zusatz von Kälberserum versetzt, mit 10.000 infektiösen Einheiten (1000 ID_{50} / ml) beimpft und für 3 Stunden bei 37° C im CO_2 - begasten Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin von virushaltigem Medium freigespült und nach Zugabe von frischem EBM für weitere 24 - 36 Stunden, bis zum Eintritt des cytopathischen Effektes, bebrütet. Das Medium der ROUX - Flaschen wurde zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (15 Minuten bei 2800 x g), der Überstand in Mengen von 1 ml ampulliert und bei - 80° C gelagert.

2.6.3. Herstellung der Monolayer - Kulturen aus Kaninchennieren

10 - 12 Tage alte Kaninchen (Kreuzung " Widder " x " Deutscher Riese ") wurden in Nembutalnarkose entblutet. Die Nieren der frisch getöteten Tiere wurden vom Fett befreit und nach Entfernung der Nierenkapsel in ca 0,5 x 0,5 cm große Stücke zerschnitten. Nach mehrmaligem Waschen der Gewebestücke mit NaCl - Phosphat - Puffer wurde der an Zelltrümmern und Erythrozyten reiche Überstand nach Absetzen der Gewebestücke verworfen. Der proteolytische Fermentaufschluß erfolgte in einem speziellen Trypsinierungsgefäß mittels der auf 37° C vorgewärmten, 0,25 % - igen, phosphatgepufferten Trypsinlösung . Der nach Trypsinierung erhaltene Überstand wurde nach ca 10 Minuten durch ein 6-faches Mullfilter dekantiert und im Eisbad auf 4° C abgekühlt. Die restlichen Gewebe-

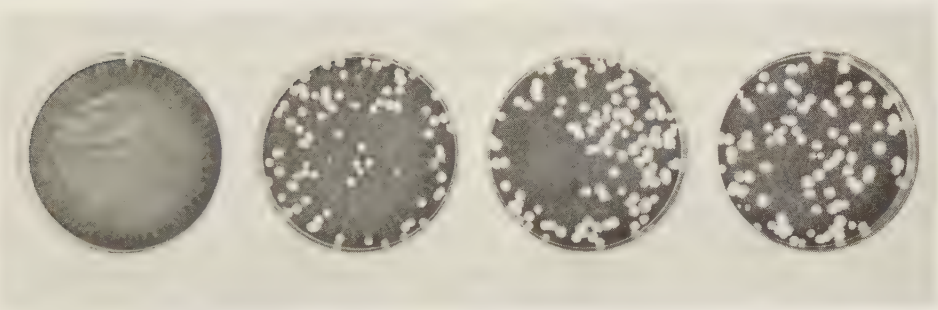
stücke wurden in frischer Trypsinlösung aufgenommen und erneut trypsiniert. Die auf diese Weise gewonnenen Filtrate wurden ca 2 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit EBM in LAHN - Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Konzentration von 1,8 x 10^6 Zellen / 5 ml Medium / Schälchen in Plastikpetrischalen (Greiner, Nürtingen; ø 6 cm) ausgesät. Nach einer zweitägigen Inkubationszeit bei 37° C in einem begasten Brutschrank (95 % Pressluft, 5 % CO_2) wurden die bereits auf dem Schalenboden angewachsenen Zellkolonien mit EBM gewaschen. Am 3. Tag nach der Aussaat hatte sich ein geschlossener Zellrasen epitheloider Morphologie für den Plaque - Reduktionstest gebildet.

2.6.4. Plaque - Reduktionstest (WAGNER, 1961)

Die Bestimmung des Interferongehaltes der Kaninchenseren und der Zellsuspensionen aus den in vitro - Versuchen erfolgte auf Monolayer - Zellkulturen von Kaninchennieren. Die dicht zugewachsenen Zellrasen wurden nach Absaugen des verbrauchten Wachstumsmediums (LAHN) zunächst mit 5 ml vorgewärmtem EBM gewaschen und erhielten dann 2 ml frisches Erhaltungsmedium (EBM). Für den Interferonnachweis wurde jede Probe in einer Verdünnungsreihe (ganzzahlige logarithmische Verdünnung zur Basis 2) mit EBM verdünnt. Die Fraktionen der isoelektrischen Fokussierungen (siehe Kap. 2.7.1.) wurden 1 : 3 bzw. 1 : 4 verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde auf drei einzelnen Kulturschälchen ausgetestet, wobei jedes Schälchen 0,2 ml der jeweiligen Verdünnung erhielt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Interferonverdünnung entfernt, die Zellkultur mit EBM gewaschen und mit VSV (Vesicular Stomatitis Virus) infiziert. Die Virusverdünnung war so eingestellt worden, daß das Inokulum 50 plaquebildende Einheiten / ml EBM

enthielt. Das Impfvirus wurde 3 Stunden bei 37° C adsorbiert. Nach Entfernung des virushaltigen Mediums wurden die Schälchen mit je 4 ml einer 0,4 % - igen Agarose - Lösung (Behringwerke, Marburg) überschichtet und für weitere 24 Stunden bei 37° C in 5 % - iger CO_2 - Atmosphäre belassen. Die Auszählung der Läsionen im Zellrasen erfolgte nach Anfärben mit Kristallviolett.

Der Interferon - Titer ist definiert als der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, welche die Plaque - Zahl gegenüber den Interferon - freien Kontrollen um 50 % reduziert (WAGNER, 1960).



Normale Kaninchen-nieren-Zellkultur

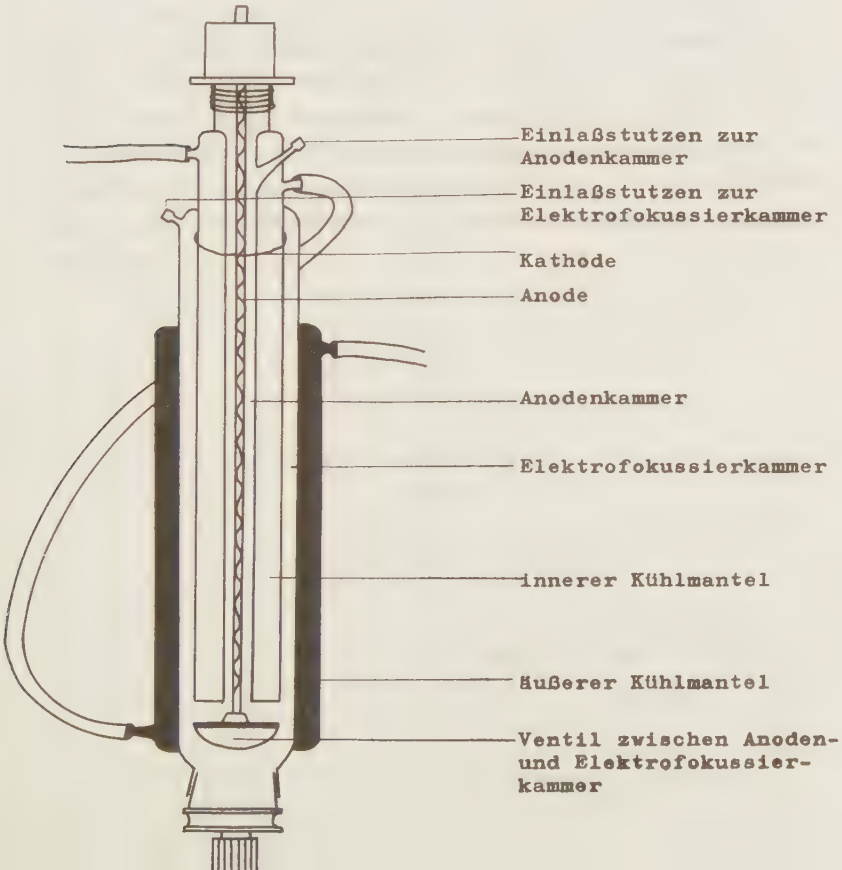
Plaque-Bildung nach VSV-Infektion

2.7. Qualitative Untersuchungen der Interferonproben

2.7.1. Isoelektrische Fokussierung

Das Funktionsprinzip der isoelektrischen Fokussierung beruht auf der Trennung von biologisch aktiven Proteinen nach ihren isoelektrischen Punkten innerhalb eines pH - Gradienten (SVENSSON, 1961), der mit Hilfe eines Saccharose - Gradienten gegen Konvektionen stabilisiert wird. Für Interferone wurde diese Methode von FANTES (1967) übernommen.
Die verwendeten Fokussiersäulen (Firma LKB-Producter AB, Stockholm - Bromma 1 - Schweden, LKB 8101) hatten ein Fassungsvolumen von 110 ml. Der pH - Gradient wurde mittels Ampholine - Trägerampholyten im pH - Bereich 3 - 10 (Firma LKB) erstellt. Dieses Ampholinegemisch enthält eine große Zahl ampholytischer Substanzen vom Typ aliphatischer Polyamino - Polycarboxylsäuren, die im Vergleich zueinander nur sehr geringe Unterschiede in den isoelektrischen Punkten aufweisen. Das Flüssigkeitssystem wurde mittels eines linearen Saccharose - Dichtegradienten (0 - 50 % Saccharose, Merck, Darmstadt) stabilisiert. Spezielle Schutzelektrolyte (Anode : 0,5 % - ige Phosphorsäure; Kathode : 0,5 % - iges Äthanolamin, Merck, Darmstadt) wurden verwendet, um die Trägerampholyte vor anodischer Oxidation bzw. kathodischer Reduktion an den Elektroden zuschützen. Ein möglichst linearer Dichte-Gradient wurde durch das Einfüllen der Elektrofokussierlösung über einen automatischen Gradientenmischer (LKB 11300 Ultrograd) erzielt. Der Gradient wurde simultan aus zwei Lösungen über eine peristaltische Pumpe (LKB 2115, Multiperpex) in 60 Minuten erstellt. Ein Netzanschlußgerät (LKB 3371, D.C. Power Supply) sorgte für eine geglättete Gleichspannung im Bereich von 0 - 1200 V. Während des gesamten Laufes wurden die Fokussiersäulen wegen der Temperatur-

abhängigkeit der isoelektrischen Punkte durch einen Kühlmantel mit einem Kältethermostaten (Wobster, Lauda) auf 4° C gehalten. Der Elektrofokussier - Prozeß war nach ca 48 - 72 Stunden abgeschlossen. Nach dieser Zeit war die Stromstärke (bei konstanter Spannung) auf einen konstanten Wert gesunken (1,2 mA), d.h. alle Trägerampholyte und damit auch die Probenproteine waren an ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert. Nach Beendigung des Laufes wurden die Säulen mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe und einem Fraktionssammler (LKB 7000, Ultrorac) gesammelt, wobei das Volumen der einzelnen Fraktionen 1,5 - 2,0 ml betrug. Die Messung der pH - Werte der einzelnen Fraktionen erfolgte mit einem Beckmann Digital - pH - Meter bei 4° C.



Nach der pH - Bestimmung wurden die Proben 1 : 3 bzw. 1 : 4 mit EBM verdünnt und in geschlossenen Plastikröhrchen bis zur Austestung bei - 20° C gelagert.

Um den Einfluß des Ampholytgemisches auf die Plaque-Bildung zu überprüfen, wurden Fokussierungen mit einem Saccharose - Ampholyt - Gemisch (ohne Probe) durchgeführt. Die Fokussierungen der Serumproben wurden anhand dieser Kontrollkurve berichtigt. Jede Interferonprobe wurde zweimal fokussiert, und von jedem Säulenlauf wurden drei Plaque - Tests mit jeweils drei Schälchen / Fraktion durchgeführt.

2.8. Sterilität

Zur Vermeidung von Kontaminationen bzw. Verschleppung von infektiösem Material wurde an einem Laminar - Flow - Gerät gearbeitet. Alle verwendeten Glasgeräte wurden vor ihrer Benutzung 2 Stunden bei 180° C im Heißluftsterilisator sterilisiert. Alle Lösungen und Interferon-haltigen Proben wurden vor ihrer Verwendung auf mögliche bakterielle Kontaminationen geprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Erstellung einer Interferon - Eichkurve

Zunächst mußte die Reproduzierbarkeit der Serum - Interferontiter, welche die Beurteilungsgrundlage der nachfolgenden Experimente bilden, gewährleistet sein. Ein Kollektiv von 5 x 5 normalen Kaninchen erhielt zur Interferon-Induktion 200 µg Poly IC / kg Körpergewicht an 5 verschiedenen Tagen. Die Beziehung zwischen Plaque - Reduktion und Interferongehalt der einzelnen Proben wurde in Einheiten / ml angegeben, wobei das Serum eines jeden Tieres individuell dreimal im Plaque - Reduktionstest geprüft wurde. Tabelle 1 zeigt die gute Reproduzierbarkeit sowie die geringe Schwankungsbreite der Interferontiter bei normalen Kaninchen unter Verwendung der gleichen Dosis und Charge des Interferon-Induktors Poly IC.

Unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate (GAUSS) wurde die Standardabweichung (s) der Einzelbeobachtungen als Maß der Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert (s_x) nach folgender Formel errechnet :

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - x)^2}{n - 1}}$$

$$s_x = \sqrt{\frac{(x_i - x)^2}{n(n - 1)}}$$

Dabei bedeuten : x = Mittelwert

x_i = alle durchlaufenen Meßwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

Tabelle 1 : Serum - Interferontiter normaler Kaninchen 2,5 Stunden nach i.v. Induktion mit 200 µg Poly IC / kg Körpergewicht.

Versuchstier	Versuchsgruppen				
	Interferontiter (= reziproker Wert der Serum - Verdünnung)				
	I	II	III	IV	V
1	1220	1280	1088	1472	1152
2	1460	1280	1320	1120	1168
3	1200	1220	1280	1360	1024
4	1024	1320	1184	1216	1130
5	1150	1428	1220	1400	1080

Für n = 25 beträgt der Mittelwert :

$$1230 \pm 26.34$$

Bei einer Serumverdünnung von 1 : 1230 ($\pm$ 26.34) betrug die Hemmung im Plaque - Reduktionstest 50 %, was der Definition einer Interferon - Einheit (IE) entspricht. Weil im Plaque - Reduktionstest aber nur 0,2 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe eingesetzt wurden, waren in der Serumverdünnung 1 : 1230 5 IE / ml enthalten. Die IE im unverdünnten Kaninchenserum betrugen 6150 / ml. Auf Grund der gemittelten Werte der für jedes der 25 Tiere individuell durchgeführten Interferon - Titration ergibt sich eine direkte Beziehung zwischen Plaque - Reduktion und der jeweiligen Serum - bzw. Probenverdünnungsstufe, wie die Dosis - Wirkungskurve erkennen läßt (Abbildung 1).

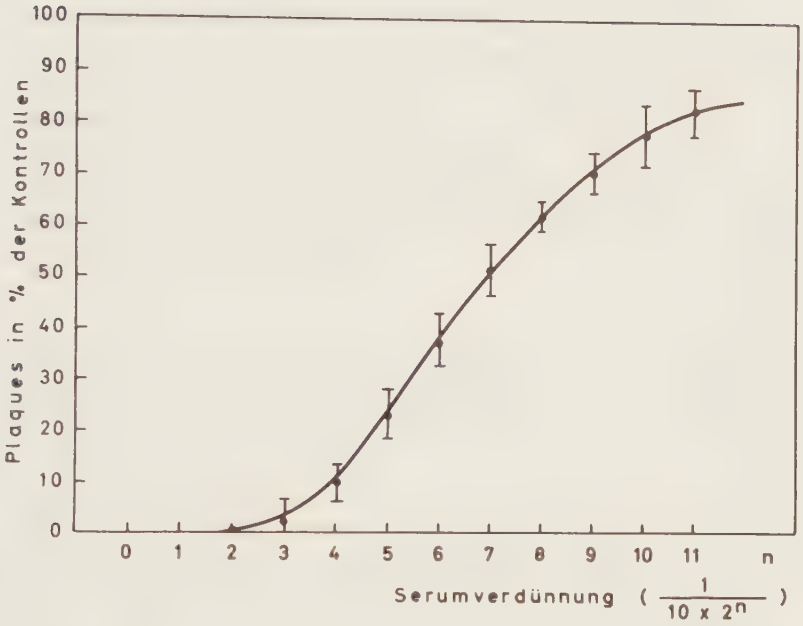


Abbildung 1 : Plaque - Reduktion in Abhängigkeit von der Serumverdünnung bei Kaninchen, 2,5 Stunden nach i.v. Poly IC - Induktion.
(Dosis - Wirkungskurve)

Aus dieser Dosis - Wirkungskurve ergibt sich die Eichkurve, welche die Abhängigkeit zwischen Interferon - Einheiten / ml und Plaque - Reduktion verdeutlicht.

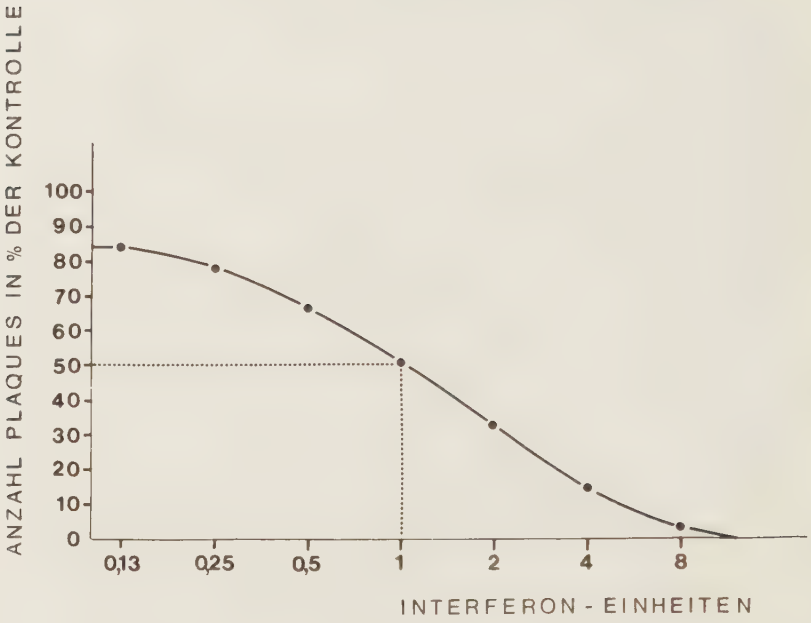


Abbildung 2 : Eichkurve für Poly IC - induziertes Serum - Interferon bei Kaninchen.

3.2. Vergleichende Titerbestimmungen des Poly IC - induzierten Serum - Interferon von normalen, entmilzten und scheinoperierten Kaninchen.

Die bedeutsame Rolle der Milz für die Interferon - Synthese nach Poly IC - oder Endotoxininduktion bei Mäusen, Ratten und Kaninchen wurde von mehreren Autoren hervorgehoben (KONO et.al., 1965; DE SOMER et.al., 1966; BORECKY et.al., 1967; ITO et.al., 1970). Ein Vergleich von normalen und entmilzten Kaninchen soll deshalb einen Eindruck von den Auswirkungen einer

Entmilzung bei Poly IC - induzierten Kaninchen vermitteln. Als Kontrolle wurden scheinoperierte Kaninchen in die Untersuchung einbezogen, wobei die Scheinoperation im Narkotisieren , Öffnen und Schließen der Bauchhöhle bestand. In dieser Versuchsreihe wurden 5 x 6 entmilzte Kaninchen (Tabelle 2) 3 x 5 scheinoperierten Tieren (Tabelle 3) gegenübergestellt und im Plaque - Reduktionstest mit Normaltieren (Tabelle 1) verglichen.

Tabelle 2 : Serum - Interferontiter bei splenektomierten Kaninchen, 2,5 Stunden nach Poly IC - Induktion.

Versuchstier	Versuchsgruppen				
	Interferontiter (=reziproker Wert der Serumverdünnung)				
	I	II	III	IV	V
1	140	184	168	210	185
2	200	165	182	175	193
3	180	210	204	170	170
4	195	198	180	194	200
5	170	170	194	203	190
6	210	205	180	180	168

Für n = 30 beträgt der Mittelwert :

$$186 \pm 3 = 930 \text{ IE / ml}$$

Tabelle 3 : Serum - Interferontiter bei scheinoperierten Kaninchen, 2,5 Stunden nach Poly IC - Induktion

Versuchstier	Versuchsgruppen		
	Interferontiter (=reziproker Wert der Serumverdünnung)		
	I	II	III
1	1024	1564	1340
2	1220	1160	1280
3	1280	1160	1090
4	1492	1056	1150
5	1080	1200	1070

Für n = 15 beträgt der Mittelwert :

$$1211 \pm 40.78 = 6055 \text{ IE / ml}$$

Ein Vergleich der Titerwerte von normalen (Tabelle 1) und scheinoperierten Kaninchen (Tabelle 3) zeigt in beiden Gruppen nahezu die gleichen Serum - Interferonspiegel ($p \geq 0.9$). Damit kann ein Einfluß der Operations - bzw. Narkosebehandlung von vornherein ausgeschlossen werden. Bei entmilzten Kaninchen (Tabelle 2) dagegen erreichte der Serum - Interferontiter nur 15 % der bei normalen ($p \leq 0.001$) und scheinoperierten Tieren ($p \leq 0.001$) beobachteten Werte (Tabelle 4).

Tabelle 4 : Gegenüberstellung der Serum - Interferontiter bei normalen, entmilzten und scheinoperierten Kaninchen, 2,5 Stunden nach Poly IC - Induktion.

Behandlungsart	Interferontiter	IE / ml
Normale Kaninchen ohne Poly IC	10	
Normale Kaninchen nach Poly IC	1231 ± 26.34	6155
Scheinoperierte Kaninchen nach Poly IC	1211 ± 40.78	6055
Entmilzte Kaninchen nach Poly IC	186 ± 3	930

3.3. Interferonspiegel in verschiedenen Organen des Kaninchens nach Poly IC - Induktion.

Wie gezeigt wurde, sind die Poly IC - induzierten Interferonspiegel bei entmilzten Kaninchen auf 15 % gegenüber Normaltieren reduziert. Die Restaktivität weist darauf hin, daß die Milz nicht der alleinige Syntheseort sein kann. Deshalb wurde untersucht, welche Organe und Blutzellen bei entmilzten Kaninchen als Interferonproduzenten nach Poly IC - Gabe in Frage kommen (Tabelle 5).
Diese Untersuchungen bezogen sich auf je ein Kollektiv von 3 entmilzten Kaninchen am 1. Tag nach Splenektomie und von 3 normalen Kaninchen, die je 200 µg Poly IC / kg i.v. erhalten hatten.

Die Tiere wurden nach 20 Minuten in Nembutalnarkose entblutet, die Organe (5 g) entnommen, zerzupft, in Hanks Lösung + 10 % Kälberserum zwei Stunden bei 37° C im Schüttelwasserbad inkubiert, und die Überstände nach Sedimentation der Zellen auf ihren Interferongehalt untersucht. Entsprechend wurde mit Leukozytensuspensionen verfahren (Tabelle 5).

Tabelle 5 : Interferon - Konzentrationen in verschiedenen Organen des Kaninchens, 2,5 Stunden nach i.v. Poly IC - Induktion.

Untersuchungsmaterial	Interferontiter I	II	III	Mittelwert
Normale Kaninchen + 200 µg Poly IC/kg				
Milz	320	450	380	383
Leber	10	10	10	10
Lunge	10	10	10	10
Blutleukozyten	20	10	10	13
Entmilzte Kaninchen + 200 µg Poly IC/kg				
Leber	120	180	100	133
Lunge	60	55	48	48
Blutleukozyten	80	72	50	67

Der in Organextrakten nachgewiesene virale Hemmfaktor wurde wegen seiner Trypsin - Empfindlichkeit, seiner Stabilität bei 56° C (1 Stunde) und bei pH 2 (für 18 Stunden bei 4° C) als Interferon charakterisiert.

Bei normalen Kaninchen lieferte die Milz tatsächlich die Hauptmenge an Interferon, während Leber, Lunge und Blutleukozyten kein Interferon produzierten. Demgegenüber steuerten Leber, Lunge und Blutleukozyten der entmilzten Kaninchen einen geringen Interferonanteil bei, welcher die Restaktivität nach Entmilzung erklären könnte.

3.4. Übertragung von Milzzell - Suspensionen auf entmilzte Kaninchen (= homologe Substitution)

Wie aus den Tabellen 2 und 4 hervorgeht, können Kaninchen am 1. Tag nach Milzentnahme nur 15 % der sonst üblichen Interferonmenge im Vergleich zu normalen Kontrollkaninchen synthetisieren. Aus dieser Feststellung ergab sich die Frage, inwieweit die reduzierten Serumspiegel durch Gaben von Milzzell - Suspensionen kompensiert werden können. Die Möglichkeit einer derartigen Kompensation ergab sich aus Untersuchungen von ITO et.al. (1973) an entmilzten Mäusen und von LAIR et.al. (1974), die mit einem neonatalen Milzzell - Transplantat die Interferonproduktion von (vererblich) milzlosen Mäusen erhöhen konnten. Auch PANTELOURIS et.al. (1976) machten ähnliche Beobachtungen bei (vererblich) thymuslosen Mäusen, deren ebenfalls sehr niedriger Serum - Interferonspiegel durch eine Milzzellgabe von normalen Donormäusen gesteigert wurde.

In 3 Vorversuchen wurde zunächst überprüft, ob die zur Übertragung aufgearbeitete Milzzellsuspension auch in der Lage ist, diese Aufgabe zu erfüllen. Es wurden jeweils Zellen von 3 Kaninchen getestet, wobei in jedem Ansatz pro 2 x 10^8 Zellen (in 10 ml Hanks Lösung) zur Induktion 50 µg DEAE - Dextran + 100 µg Poly IC verwendet wurden (Tabelle 6). Die Suspension wurde dann 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad geschüttelt, dreimal zur Entfernung des Induktors zen-

trifugiert, resuspendiert und weitere 3 Stunden geschüttelt. Schließlich erfolgte die Interferonbestimmung im Überstand.

Tabelle 6 : Interferon - Titer von Kaninchen - Milzzellen in vitro, 4 Stunden nach Poly IC - Induktion.

Zellansatz	Interferontiter		
	I	II	III
1	1080	1200	1170
2	960	1170	1300
3	1200	820	990

Für n = 9 beträgt der Mittelwert :

$$1098 \pm 49.98$$

Nach 4 Stunden Inkubationszeit mit dem Interferoninduktor Poly IC + DEAE - Dextran lag in der Milzzellsuspension annähernd der gleiche Interferontiter wie im Serum normaler Kontrollkaninchen vor ($p \leq 0,05$ und $> 0,01$), was wiederum bestätigt, daß normalerweise nahezu die gesamte Interferonmenge durch die Milz synthetisiert wird.
Nach diesem Vorversuch wurden frisch gewonnene Kaninchen - Milzzellsuspensionen auf entmilzte Tiere übertragen, und 2 Stunden später die Interferoninduktion mit 200 µg Poly IC / kg Körpergewicht vorgenommen. Die Ergebnisse beziehen sich auf 4 Versuche mit je 5 Tieren, die jeweils ca 1×10^8 Milzzellen - was der Zellzahl der Milz eines 4 - 6 Wochen alten Kaninchens entspricht - i.v. in die Ohrvene erhalten hatten (Tabelle 7).

Tabelle 7 : Serum - Interferontiter von entmilzten Kaninchen nach i.v. Gabe von homologen Milzzellen

Versuchstier	Versuchsgruppen			
	Interferontiter (=reziproker Wert der Serumverdünnung)			
	I	II	III	IV
1	1280	1150	1350	1290
2	1370	1280	1400	1098
3	1152	1180	1150	1160
4	1408	1280	1220	1270
5	1200	1170	1260	1300

Für n = 20 beträgt der Mittelwert :

$$1248 \pm 20.17$$

Injizierte man den Tieren nur die Zellsuspension, ohne sie daraufhin mit Poly IC zu stimulieren, so zeigte sich kein meßbarer Interferontiter. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die i.v. Injektion von Zellen des lymphatischen Systems, möglicherweise über eine ' graft - versus - host - reaction ', schon zur Interferonstimulierung führt, wie SVET - MOLDAVSKY et.al. (1974) behaupteten.

Während Tabelle 7 einen Überblick über die durch homologe Substitution der entnommenen Milz erreichbaren Titer vermitteln sollte, wird in Tabelle 8 der Serum - Interferonspiegel von entmilzten, substituierten Kaninchen mit den Titerwerten der entsprechenden Kontrolltiere verglichen.

Tabelle 8 : Einfluß einer Milzzellgabe auf entmilzte Kaninchen.

Behandlung vor der i.v. Injektion von Poly IC	Serum - Interferontiter nach 200 µg Poly IC / kg	
	I	II
Normale Kaninchen	1200	1032
Scheinoperierte Kaninchen	1090	1180
Normale Kaninchen +$1x10^8$ Milzzellen in 5 ml Hanks Lsg.	1098	1150
Entmilzte Kaninchen	192	148
Entmilzte Kaninchen + 5 ml Hanks Lsg.	170	156
Entmilzte Kaninchen +$1x10^8$ Milzzellen in 5 ml Hanks Lsg.	1280	1400

Aus diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß eine Milzzellsuspension junger Kaninchen in der Lage ist, die durch Milzexstirpation verlorene Interferon - Synthesekapazität zu kompensieren.

3.5. Milzzell - Transplantation von Meerschweinchen-Milzzellen auf entmilzte Kaninchen (= heterologe Substitution)

Nachdem sich eine homologe Übertragung von Milzzellen als erfolgreich erwiesen hatte, stellte sich nun die Frage, ob auch ein heterologes Milzzell - Transplantat die Fähigkeit besitzt, den reduzierten Interferonspiegel der entmilzten Kaninchen zu heben. Auch hierbei wurden Meerschweinchen - Milzzellen in einem Vor-

test in vitro mit Poly IC induziert und die Proben auf Kaninchen-Nierenzellen und, um die postulierte Spezies - Spezifität zu überprüfen, auch auf Meerschweinchen-Nierenzellkulturen ausgewertet. Im Gegensatz zu Kaninchen - Interferon, welches nur auf Kaninchen-Nierenzellen nachweisbar ist, konnte Meerschweinchen-Interferon in beiden Zellsystemen mit nur geringen Abweichungen nachgewiesen werden (Tabelle 9). Es zeigte sich also auch hier, daß die Genus-spezifische Wirkung von Interferon eine mögliche, jedoch nicht notwendige Eigenschaft des Moleküls darstellt.

Tabelle 9 : Interferontiter von Meerschweinchen-Milzzellen in vitro, 4 Stunden nach Poly IC - Induktion.
(getestet auf Meerschweinchen-Nierenzellen)

Zellansatz	Versuchsgruppen		
	Interferontiter		
	I	II	III
1	780	750	920
2	890	800	870
3	690	940	650

Für n = 9 beträgt der Mittelwert :

$$810 \pm 34.08$$

Nachdem die Induktion des Interferon in vitro erfolgreich war, wurde die heterologe Milzzell - Suspension als Ersatz für das entnommene Organ auf die entmilzten Kaninchen übertragen. Es wurden 3 Versuche mit

je 4 Tieren durchgeführt, denen je 1 x 10^8 Milzzellen von Meerschweinchen appliziert wurden (Tabelle 10).

Tabelle 10 : Serum - Interferontiter nach i.v. Injektion von Meerschweinchen - Milzzellen an entmilzte Kaninchen (2,5 Stunden nach Poly IC-Induktion)

Versuchstier	Versuchsgruppen		
	Interferontiter		
	I	II	III
1	624	848	2560
2	640	2240	980
3	1024	832	1380
4	2496	1280	1085

Für n = 12 beträgt der Mittelwert :

$$1332 \pm 198.5$$

Auch bei der heterologen Substitution wurden annähernd die gleichen Serum - Interferontiter wie bei normalen Kontrollkaninchen erreicht ($p > 0,05$). Die Streuung war jedoch sehr viel breiter als bei einer homologen Substitution. Tabelle 11 soll eine Übersicht über die Interferontiter von normalen und entmilzten Kaninchen sowie nach heterologer Substitution geben (ausgetestet auf Kaninchen - und Meerschweinchen - Nierenzellen). Kaninchen - Interferon zeigte keinerlei Aktivität auf Meerschweinchen - Nierenzellen,

während im Gegensatz dazu Meerschweinchen - Interferon auf beiden getesteten Zellsystemen aktiv war.

Ein Milzzell - Transplantat ist also in der Lage, die Interferon - Synthesefähigkeit von entmilzten Kaninchen völlig zu kompensieren, gleichgültig, ob es sich um syngenische (= Kaninchen -) oder xenogenische (= Meerschweinchen -) Milzzellen handelt.

Tabelle 11 : Zusammenfassung der Serum - Interferontiter von entmilzten und scheinoperierten Kaninchen nach i.v. Injektion von 200 µg Poly IC / kg
(ausgetestet auf Kaninchen - und Meerschweinchen - Nierenzellen)

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter, untersucht auf	
	Kaninchen - Nierenzellen	Meerschweinchen - Nierenzellen
Normale Kaninchen	1120	-
Scheinoperierte Kaninchen	1098	-
Entmilzte Kaninchen	240	-
Entmilzte Kaninchen +1×10^8 Meerschweinchen-Milzzellen	1332	-
Kaninchen-Milzzellen in vitro induziert	920	-
Meerschweinchen-Milzzellen, in vitro induziert	670	810

3.6. Milzzell - Transplantation von Mäuse - Milzzellen auf entmilzte Kaninchen (heterologe Substitution)

Um die Möglichkeiten einer heterologen Substitution der entnommenen Milz zu erweitern, wurde der Versuch unternommen, auch eine Maus-Milzzell-Suspension auf ihre Kompensationsfähigkeit zu überprüfen. Pro entmilztes Tier wurden ca 1 x 10^8 Milzzellen i.v. injiziert. Die Testung der Serumproben erfolgte auf Kaninchen-Nieren-Zellkulturen sowie auf L - Zellen (permanente Maus - Zellen). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 : Serum - Interferontiter entmilzter Kaninchen nach i.v. Injektion von Mäuse-Milzzellen, 2,5 Stunden nach Poly IC - Induktion

Versuchstier		Versuchsgruppen		
		Interferontiter		
		I	II	III
A. getestet auf	1	82	100	150
KN-Zellen	2	164	98	170
	3	104	210	280
	4	300	180	96
	Mittelwert :	161	± 20.94	
Kontrollen:				
Normale Kaninchen		1180	1320	1280
Entmilzte Kaninchen		220	190	158
B. getestet auf	1	60	20	30
L - Zellen	2	84	28	73
	3	30	42	68
	4	10	54	49
	Mittelwert :	46	± 6.5	
Kontrollen:				
Normale Kaninchen		16	38	25
Entmilzte Kaninchen		10	24	32

Bei dieser heterologen Substitution durch Mäuse - Milzzellen wurden keineswegs - wie beim Ersatz durch Meerschweinchen - Milzzellen die Serum - Interferontiter normaler Kaninchen nach Poly IC - Induktion erreicht. Die Titerwerte zeigten sowohl bei der Auswertung auf Kaninchen-Nieren-Zellen als auch auf L - Zellen größere Schwankungen und deuten auf keinen Kompensationserfolg hin. Die Möglichkeit einer heterologen Substitution der entnommenen Milz ist also offensichtlich auf bestimmte Zellarten (Spezies) beschränkt.

Bei dem Versuch, die entnommene Milz durch andere Zellen des RES, z.B. Lunge, Leber oder Blutleukozyten zu ersetzen, konnte keine signifikante Kompensation erreicht werden.
Offensichtlich sind nur Milzzellen - und zwar am effektivsten Milzzellen 4 - 6 Wochen alter Tiere (Kaninchen und auch Meerschweinchen) - befähigt, die Interferonbildung der entfernten Milz zu übernehmen.

3.7. Einfluß der Zellzahl auf die Substitution (Dosis - Wirkungs - Beziehung)

In der folgenden Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob die erfolgreiche homologe Substitution der entnommenen Milz durch Milzzellen 4 - 6 Wochen alter Kaninchen Dosis - abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden den entmilzten Kaninchen unterschiedliche Zellkonzentrate (Differenz um 2 log) 2 Stunden vor Poly IC - Induktion i.v. injiziert (Tabelle 13).

Tabelle 13 : Einfluß der Zellzahl auf die Substitution der entmilzten Kaninchen durch eine homologe Milzzell - Suspension.

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter				
	I	II	III	IV	Mittelwert
Normale Kaninchen	1280	1220	1180	1920	1400
Entmilzte Kaninchen	150	200	180	280	202
Entmilzte Kaninchen + 5 ml NaCl,physiol.	178	110	200	305	198
Entmilzte Kaninchen + $3x10^2$ Milzzellen	416	600	540	480	509
Entmilzte Kaninchen + $3x10^4$ Milzzellen	480	900	600	600	645
Entmilzte Kaninchen + $3x10^6$ Milzzellen	1152	900	1024	1024	1025
Entmilzte Kaninchen + $3x10^8$ Milzzellen	1180	900	1080	1536	1174
Entmilzte Kaninchen + $3x10^{10}$ Milzzellen	1090	1100	1280	1120	1148

Durch eine Erhöhung der Zellzahl ließ sich der Interferontiter im Serum von entmilzten Kaninchen kontinuierlich steigern. Aus Abbildung 3 geht hervor, daß eine solche Steigerung nur bis annähernd 10^7 Milzzellen zu erreichen ist. Hier stellte sich ein

Sättigungswert ein, der dem Serum - Interferontiter normaler Kaninchen nach Poly IC - Induktion entsprach und nicht mehr gesteigert werden konnte.

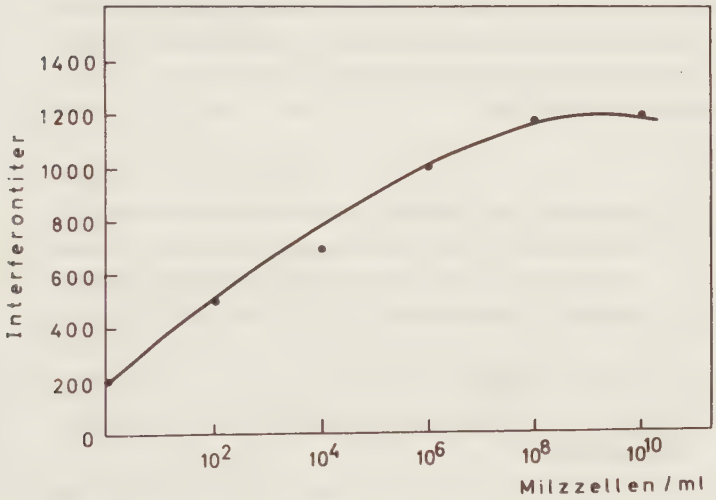


Abbildung 3 : Dosis - Wirkungs - Beziehung zwischen i.v. applizierter Milzzell - Konzentration und Serum - Interferontiter bei entmilzten Kaninchen.
Der Interferontiter wurde im Plaque - Reduktionstest ermittelt und als reziproker Wert derjenigen Verdünnungsstufe angegeben, die eine 50 % - ige Plaquehemmung gegenüber den Interferon-freien Kontrollen erzielte.

3.8. Zelltrennung von Milzleukozyten in Lymphozyten und Granulozyten

Eine komplette Milzzell-Suspension, bestehend aus 80 - 90 % Lymphozyten, 4 - 12 % Granulozyten und 4 - 16 % anderen Zellen, war in der Lage, die exstirpierte Milz von Kaninchen in bezug auf die Interferon-Synthesekapazität zu ersetzen.
Zweck der nachfolgenden Untersuchung war es, die Frage zu klären, welche dieser Zellen für den kompensatorischen Effekt infrage kommen oder ob dafür alle Milzzellen gleichermaßen verantwortlich sind.
Verglichen wurde 3 verschiedene Leukozyten - Trennungsverfahren.

3.8.1. Trennung von Lymphozyten, Granulozyten und Erythrozyten im diskontinuierlichen Dichte-Gradienten (Doppelgradient) aus Ficoll - Hypaque (Ronpacon)

Die Trennung erfolgte wie in " Material und Methoden " beschrieben, wobei die Monozyten-Verunreinigung 4 - 8 % betrug.
Die Substitution wurde mit jeweils 10^8 Zellen durchgeführt, da diese Dosis zu einem " Sättigungswert " führte, der auch durch höhere Zellkonzentrationen nicht mehr überboten werden konnte (Tabelle 14).

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, ersetzen die Lymphozyten (Interferontiter : 904 $\pm$ 25.75) offensichtlich wirkungsvoller den Verlust der Milz als die Granulozyten (Interferontiter : 259 $\pm$ 23.85).
Der im " t " - Test nach " STUDENT " ermittelte p - Wert beträgt : $p \leq 0.001$.

Tabelle 14 : Serum - Interferontiter entmilzter Kaninchen nach Injektion von Lymphozyten bzw. Granulozyten (getrennt nach ENGLISH und ANDERSEN, 1974 mit der Doppel - Gradienten - Methode)

Behandlung vor der Poly IC - Induktion		Interferontiter I	II	III	IV	Mittelwert
Normale Kaninchen		1024	1260	1180	990	1114
Entmilzte Kaninchen		180	200	160	130	168
Entmilzte Kaninchen + 5 ml NaCl,physiol.		184	180	180	120	166
Entmilzte Kaninchen + $1x10^8$ Lymphozyten	1	920	1010	890	950	963
	2	1100	900	830	690	880
	3	865	820	1090	910	921
	4	930	900	860	805	874
	Mittelwert :		904	±	25.75	
Entmilzte Kaninchen + $1x10^8$ Granulozyten	1	280	320	160	400	290
	2	150	300	160	198	202
	3	170	120	180	380	213
	4	350	390	300	280	330
	Mittelwert :		259	±	23.85	

3.8.2. Trennung von Lymphozyten und Granulozyten mit dem Röntgenkontrastmittel " Uromiro " nach OTTO (1970)

Um die Aussage der Zelltrennungs - Ergebnisse durch eine weitere Methode zu stützen, wurde eine Trennung von Lymphozyten und Granulozyten bzw. Ring - und Sedimentzellen mit dem Röntgenkontrastmittel " Uromiro " nach OTTO (1970) durchgeführt.
Die Trennung mit " Uromiro " ergab kein so eindeutiges Ergebnis wie die im Ficoll-Hypaque-Doppelgradienten. Jedoch erwiesen sich auch in diesem Falle die Lymphozyten bzw. " Ringzellen (nach OTTO) " mit einem Interferontiter von 737 $\pm$ 68.88 gegenüber den Granulozyten " Sedimentzellen (nach OTTO) " mit einem Titer von 263 $\pm$ 21.85 als die wirksameren Interferonproduzenten und spielten deshalb kompensatorisch die Hauptrolle (Tabelle 15).

Tabelle 15 : Aktivität von Ring - (= Lymphozyten) und Sedimentzellen (= Granulozyten), getrennt nach OTTO (1970)

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter			
	I	II	III	Mittel - wert
Normale Kaninchen	1280	1220	1100	1200$\pm$52.91
Entmilzte Kaninchen	200	140	120	153$\pm$24.0
Entmilzte Kaninchen + 5 ml NaCl,physiol.	180	160	180	173$\pm$ 6.85
Entmilzte Kaninchen + 10^8 "Ringzellen"	700	870	640	737$\pm$68.88
Entmilzte Kaninchen + 10^8"Sedimentzellen	290	220	280	263$\pm$21.85

3.8.3. Trennung von Lymphozyten und Granulozyten mit der Ficoll - Paque - Methode (Pharmacia, Uppsala)

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der 3. Trennungsmethode (Ficoll-Paque-Trennung). Auch diese Art der Trennung bestätigt die Effektivität der Lymphozyten bei der Zellsubstitution von entmilzten Kaninchen. Die Lymphozyten (Interferontiter : 857 $\pm$ 48.07) waren etwa 3 mal aktiver als die Granulozyten (Interferontiter : 253 $\pm$ 34.8).

Tabelle 16 : Aktivität von Lymphozyten und Granulozyten, getrennt mit der Ficoll-Paque-Methode

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter I	II	III	Mittelwert
Normale Kaninchen	1080	1140	990	1070$\pm$43.58
Entmilzte Kaninchen	240	180	200	207$\pm$17.63
Entmilzte Kaninchen + 5 ml NaCl,physiol.	180	210	130	207$\pm$33.33
Entmilzte Kaninchen + 10^8 Lymphozyten	830	950	790	857$\pm$48.07
Entmilzte Kaninchen + 10^8 Granulozyten	310	260	190	253$\pm$34.80

3.8.4. Trennung von Meerschweinchen - Milzzellen nach den genannten 3 Methoden

Ebenso wie die Kaninchen - Milzzellen wurden auch die Milzzellen von Meerschweinchen nach den verschiedenen Methoden getrennt und entmilzten Kaninchen injiziert (Tabelle 17).

Tabelle 17 : Serum - Interferontiter von entmilzten Kaninchen nach i.v. Injektion von 10^8 Lymphozyten oder 10^8 Granulozyten aus Meerschweinchen - Milzen

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter I	II	III	Mittelwert
Normale Kaninchen	1136	1280	1090	1169 ± 57.22
Entmilzte Kaninchen	190	270	205	222 ± 24.55
Entmilzte Kaninchen + 5 ml NaCl,physiol.	160	290	250	200 ± 45.09
" Uromiro " :				
Entmilzte Kaninchen + Lymphozyten	610	590	650	617 ± 17.63
Entmilzte Kaninchen + Granulozyten	210	240	190	213 ± 14.53
" Ficoll-Paque " :				
Entmilzte Kaninchen + Lymphozyten	760	690	630	693 ± 37.56
Entmilzte Kaninchen + Granulozyten	160	230	200	197 ± 20.27
" Ronpacon " :				
Entmilzte Kaninchen + Lymphozyten	950	810	790	850 ± 50.33
Entmilzte Kaninchen + Granulozyten	210	180	250	217 ± 20.44

3.9. Trennung von T - und B - Lymphozyten

Um die zur Kompensation der entnommenen Milz befähigten Lymphozyten noch weiter zu differenzieren, wurde eine Trennung in T - und B - Lymphozyten versucht. Für diese Zielsetzung wurde eine bisher nur bei Ratten - und Mäuse - Lymphozyten angewandte Methode verwendet (JULIUS et.al., 1973), die zwar keine selektive Trennung von T - und B - Zellen zuläßt, aber unter Eliminierung der Immunglobulin - tragenden B - Zellen schnell und effektiv zur Isolierung funktioneller T - Lymphozyten führt. Der Substitutionserfolg der durch Nylonwolle aufgetrennten Zellsuspension ist Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18 : Serum - Interferontiter entmilzter Kaninchen nach i.v. Injektion von " T " - Lymphozyten.

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter			
	I	II	III	Mittelwert
Normale Kaninchen	1090	1120	975	1062 ± 44.19
Entmilzte Kaninchen	180	210	150	180 ± 17.32
Entmilzte Kaninchen + 1 x 10^8 " T " - Lymphozyten	620	480	510	
	700	390	660	
	580	680	400	557 ± 39.15

Das Problem dieser Untersuchung lag darin, daß die gewonnene Zellen nicht durch Einsatz von Anti-theta-Serum eindeutig als T - Lymphozyten charakterisiert

werden konnten, da im Handel kein entsprechendes Präparat vorlag und eine eigene Herstellung mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht durchführbar war. Die Angaben in der Tabelle beziehen sich also immer auf solche Zellen, die nicht an Nylonwolle adsorbierten und sich darin wie T - Lymphozyten verhielten. Nach JULIUS et.al. (1973) enthält eine derartige Milzzell-Kultur 85 - 90 % T - Zellen, weniger als 5 % B - Zellen und ungefähr 10 % nicht identifizierbare Zellen.

3.10. Einfluß des Applikationsortes (i.v. / i.p.) der Milzzell - Suspension auf die Substitution.

Eine weitere Untersuchung galt der Frage, ob der Injektionsort der substituierenden Zellsuspension von Einfluß auf den Titer des Serum - Interferon von entmilzten Kaninchen ist. Es wurden jeweils 1×10^8 Milzzellen junger Kaninchen den entmilzten Tieren i.v. bzw. i.p. injiziert, wobei jeweils ein Kollektiv nach 2 Stunden und ein weiteres nach 24 Stunden i.v. mit Poly IC zur Interferon - Synthese stimuliert wurde (Tabelle 19)

Tabelle 19 : Serum - Interferontiter entmilzter Kaninchen nach i.v. / i.p. Injektion einer Milzzell - Suspension 4 - 6 Wochen alter Kaninchen

Behandlung vor der Poly IC - Induktion	Interferontiter I	II	Mittelwert
Normale Kaninchen	1280	1800	1540 ± 260
Entmilzte Kaninchen	180	160	170 ± 10
Entmilzte Kaninchen + 5 ml NaCl,physiol.	188	202	195 ± 7
Entmilzte Kaninchen + Milzzellen i.p., nach 2 Stdn. PolyIC	40 38	62 34	44 ± 6.29
Entmilzte Kaninchen + Milzzellen i.p., nach 24 Stdn. Poly IC	640 480	420 380	480 ± 57.15
Entmilzte Kaninchen + Milzzellen i.v., nach 2 Stdn. PolyIC	1080 970	890 1000	985 ± 39.26
Entmilzte Kaninchen + Milzzellen i.v., nach 24 Stdn. Poly IC	880 800	1024 930	909 ± 46.89

Wurde die Poly IC - Induktion 2 Stunden nach i.p. Milzzell - Injektion vorgenommen, blieb der Interferontiter auf der Höhe der entmilzten Kontrolltiere

(= ohne Zellgabe). Induzierte man die Interferonsynthese jedoch erst 24 Stunden nach der i.p. Milzzellgabe, so erreichten die entmilzten Kaninchen nahezu den Serum - Interferonspiegel normaler Kontrollkaninchen. Bei einer i.v. Applikation des Milzzell - Transplantats trat dagegen die kompensatorische Wirkung der Zellen schon nach 2 Stunden in Erscheinung. Es wurden Serum - Interferontiter wie bei normalen, nicht entmilzten Kaninchen erreicht. Eine entsprechende Antwort trat ein, wenn die Induktion 24 Stunden später erfolgte.

3.11. Qualitative Untersuchungen der Serum - Interferonproben von normalen und entmilzten Kaninchen nach homologer und heterologer Substitution durch Milzzellen junger Kaninchen mittels Isoelektrischer Fokussierung

Die nachfolgenden Untersuchungen der gewonnenen Interferonproben sollten Aufschluß darüber geben, ob sich die einzelnen Interferone von entmilzten Kaninchen, mit und ohne Substitution durch Milzzellen, hinsichtlich ihres Verhaltens bei der isoelektrischen Fokussierung unterscheiden.
Zunächst wurde das Serum - Interferon normaler Kaninchen nach Induktion in vivo (200 µg Poly IC / kg Körpergewicht) mit dem in vitro induzierten Kaninchenmilz - Interferon verglichen (Abbildungen 4 und 5).

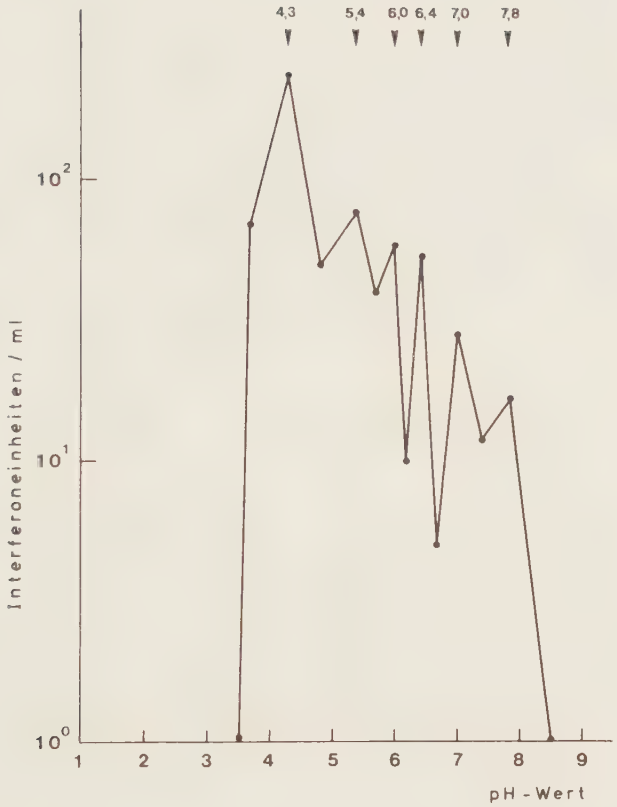


Abbildung 4 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Serum - Interferon normaler Kaninchen, 2,5 Stunden nach Induktion.

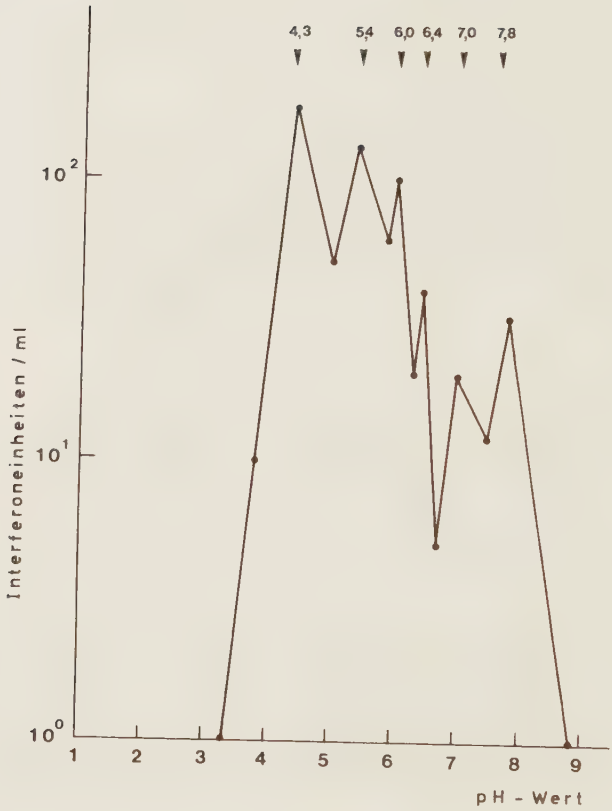


Abbildung 5 : Isoelektrische Fokussierung von in vitro induziertem Kaninchenmilz - Interferon, 4 Stunden nach Induktion.

Serum - und Milzzell - Interferone zeigten identische Aktivitätsmaxima bei pH 4.3, 5.4, 6.0, 6.4, 7.0 und 7.8, was den Schluß zuläßt, daß der Hauptanteil des Serum - Interferons normaler Kaninchen nach Poly IC-Stimulierung von Milzzellen stammt (Abbildungen 4 und 5). Ein weiteres Ergebnis stützte die Vorstellung, daß der Milzanteil für das isoelektrische Verhaltensmuster von normalen Kaninchen verantwortlich ist. Abbildung 6 zeigt die isoelektrischen Punkte eines Interferons, welches bei normalen Kaninchen in vivo induziert und dann, nach Entnahme der Milz, von diesem Organ in vitro synthetisiert wurde.

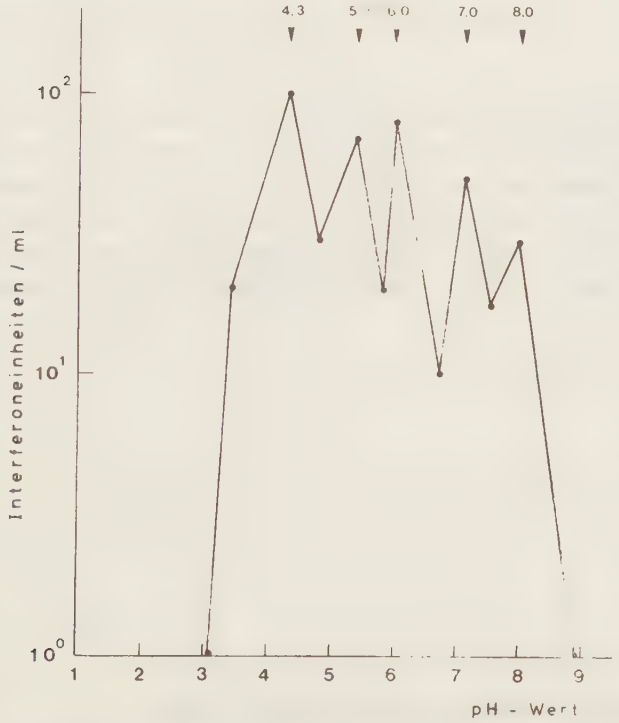


Abbildung 6 : Isoelektrische Fokussierung eines in vivo induzierten und in vitro synthetisierten Milz-Interferons.

Die Aktivitätsgipfel lagen bei pH 4.3, 5.3, 6.0, 7.1 und 8.0. Sie stimmten mit dem Muster normaler, Poly IC - induzierter Kaninchen und ebenso mit dem in vitro induzierten Milz - Interferon überein. Auf Grund dieser Ergebnisse stellte sich nun die Frage, ob die entmilzten Kaninchen nach Poly IC - Induktion die gleichen, wenn auch reduzierten Werte normaler Kaninchen aufweisen oder ob möglicherweise andere Gipfel hervortreten. Abbildung 7 zeigt die Aktivitätsmaxima des Serum - Interferons von entmilzten Kaninchen nach Poly IC - Induktion.

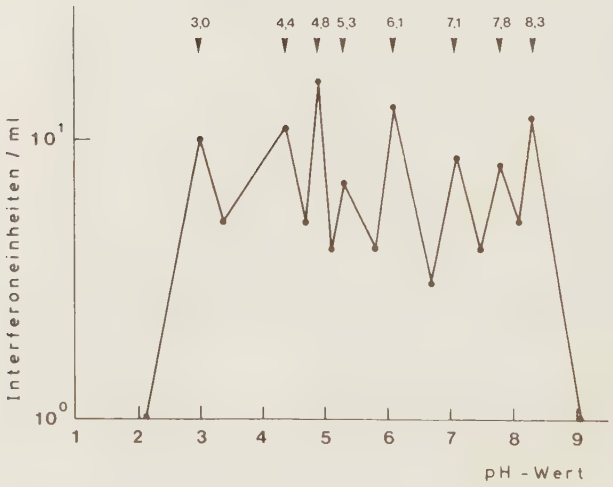


Abbildung 7 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Serum-Interferon entmilzter Kaninchen

Im Vergleich zum Serum - Interferon normaler Kaninchen wiesen die entmilzten Tiere folgende Werte auf :

Versuchstiere	pH - Wert (isoelektrische Punkte)							
Normale Kaninchen		4.3		5.4	6.0	6.4	7.0	7.8
Entmilzte Kaninchen	3.0	4.4	4.8	5.3	6.1		7.1	7.8	8.3

Es traten demnach 3 neue Gipfel bei pH 3.0, 4.8 und 8.3 auf, während der Gipfel bei pH 6.4 nicht mehr beobachtet wurde (Abbildung 7). Bei der Suche nach der Herkunft dieser neuen Maxima stellte sich heraus, daß die Interferone aus in vitro - induzierten Blutlymphozyten neben anderen ebenfalls diese Peaks aufwiesen (Abbildung 8).

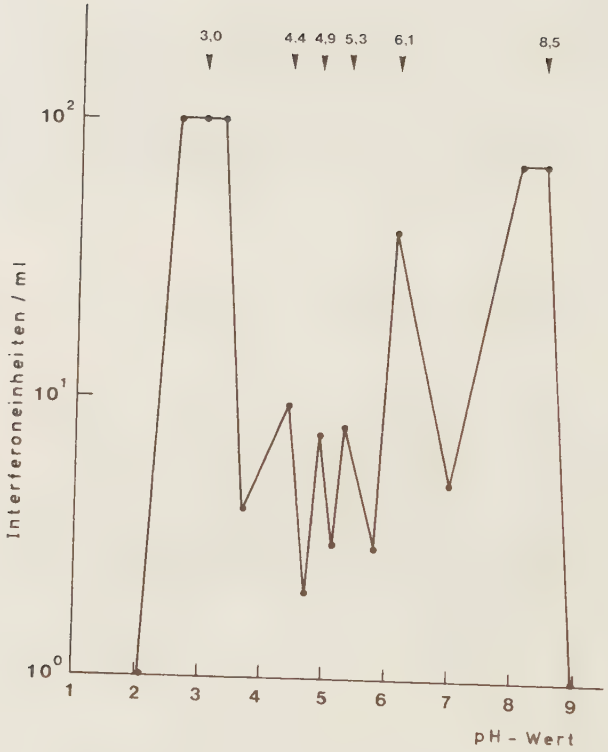


Abbildung 8 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Interferon aus Blutlymphozyten.

Deutliche Maxima lagen bei pH 3.0, 4.4, 4.9, 5.3, 6.1 und 8.5.

Der nächste Untersuchungsschritt galt der Frage, ob entmilzte Kaninchen, die i.v. eine Milzzell-Suspension erhalten hatten, bei der isoelektrischen Fokussierung ihres Serum - Interferons die Ladungsmuster entmilzter Tiere zeigen oder ob sie je nach Art der applizierten Zellsuspension die Aktivitätsgipfel der Substituenten aufweisen (Abbildungen 9 bis 15).

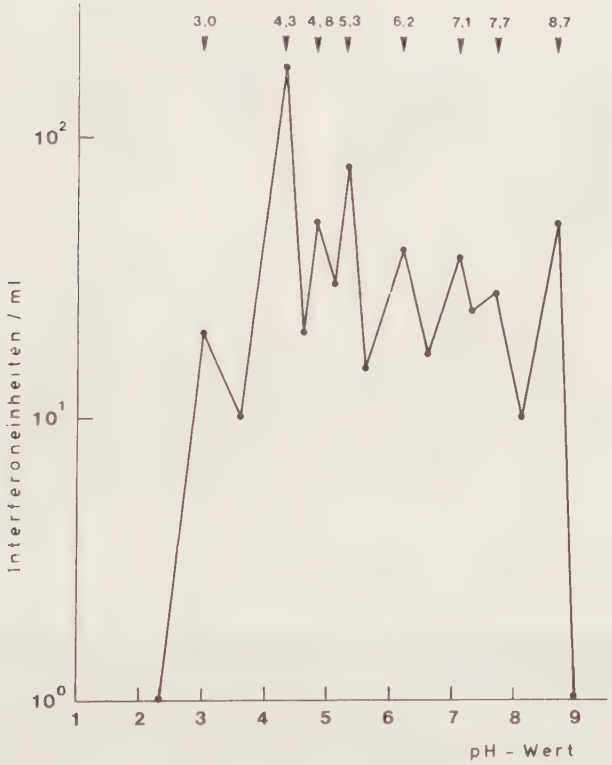


Abbildung 9 : Isoelektrische Fokussierung von PolyIC-induziertem Serum - Interferon eines entmilzten Kaninchens nach i.v. Applikation von $1x10^8$ Kaninchen-Milzzellen.

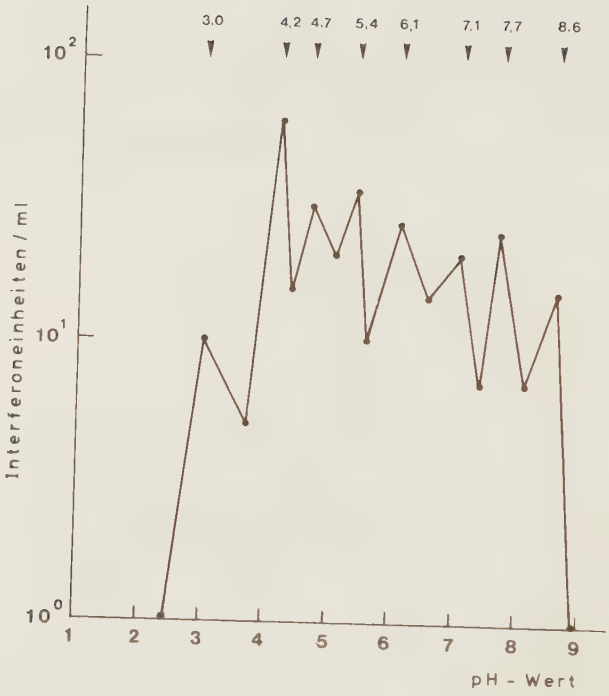


Abbildung 10 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Serum - Interferon eines entmilzten Kaninchens nach i.v. Applikation von $1x10^8$ Kaninchenmilz - Lymphozyten.

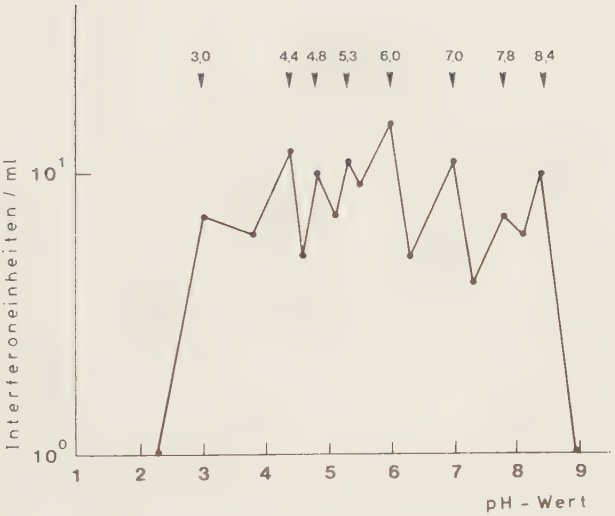


Abbildung 11 : Isoelektrische Fokussierung von PolyIC-induziertem Serum - Interferon eines entmilzten Kaninchens nach i.v. Injektion von $1x10^8$ Kaninchenmilz - Granulozyten.

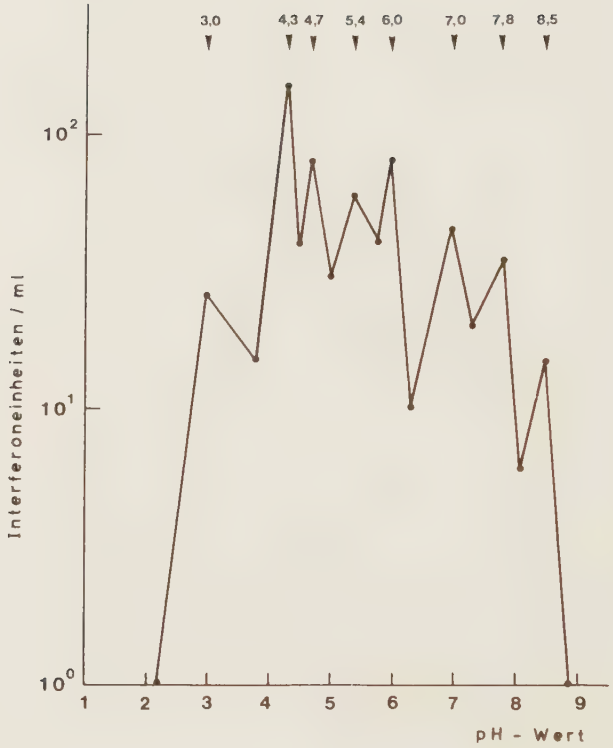


Abbildung 12 : Isoelektrische Fokussierung von PolyIC-induziertem Serum - Interferon entmilzter Kaninchen nach i.v. Injektion von $1x10^8$ Meerschweinchen - Milzzellen.

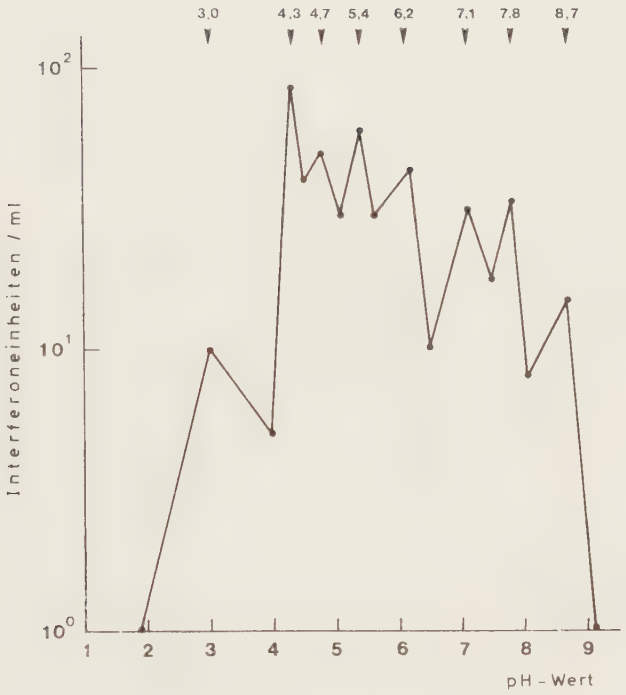


Abbildung 13 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Serum - Interferon entmilzter Kaninchen nach i.v. Injektion von $1x10^8$ Meerschweinchen-Lymphozyten.

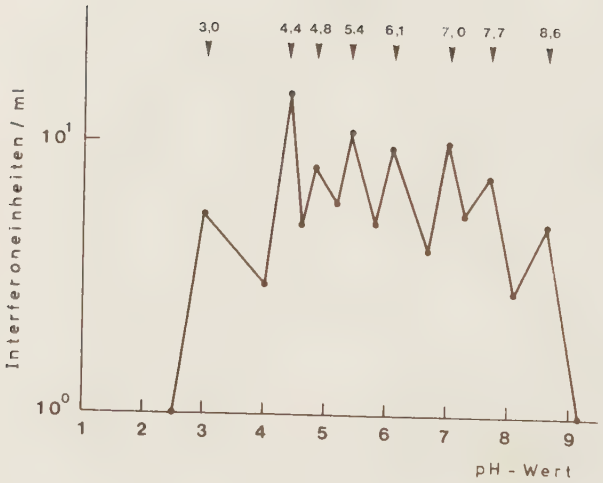


Abbildung 14 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Serum - Interferon entmilzter Kaninchen nach i.v. Injektion von $1x10^8$ Meerschweinchenmilz-Granulozyten.

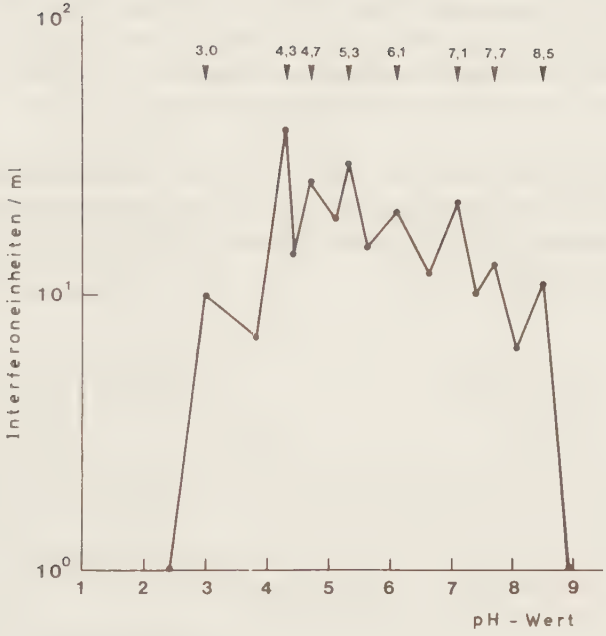


Abbildung 15 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Serum - Interferon entmilzter Kaninchen nach i.p. Injektion von $1x10^8$ Kaninchen - Milzzellen.

Die pH - Aktivitätsmaxima der Serum - Interferone entmilzter Kaninchen, die eine i.v. Injektion von Milzzellen junger Kaninchen erhalten hatten, zeigten - unabhängig von der Art und Spezies der Substituenten - immer die gleichen Ladungsmuster wie die Serum - Interferone normaler Kaninchen nach Poly IC-Induktion. Zusätzlich waren noch die Gipfel zu erkennen, die bei entmilzten Tieren möglicherweise von Blutlymphozyten - Interferon stammten. Auch die i.p. Injektion einer substituierenden Milzzell - Suspension lieferte das gleiche Aktivitätsmuster.

Tabelle 19 gibt eine Übersicht über die Ladungsmuster der Serum - Interferone von entmilzten Kaninchen nach Substitution des entnommenen Organs durch Milzzellen junger Kaninchen.

Tabelle 19 : Übersicht über die Ladungsmuster der Serum - Interferone entmilzter Kaninchen nach Injektion einer Milzzell - Suspension

Behandlung vor der PolyIC - Induktion	Ladungsverteilung bei der isoelektrischen Fokussierung (pH - Werte)
Normale Kaninchen	4.3 5.4 6.0 6.4 7.0 7.8
Entmilzte Kaninchen	3.0 4.4 4.8 5.3 6.1 7.1 7.8 8.5
Entmilzte Kaninchen + Kaninchen-Milzzellen i.v.	3.0 4.3 4.8 5.3 6.2 7.1 7.7 8.7
Entmilzte Kaninchen + Kaninchen - Milz - Lymphozyten, i.v.	3.0 4.2 4.7 5.4 6.1 7.1 7.7 8.6
Entmilzte Kaninchen + Kaninchen - Milz - Granulozyten, i.v.	3.0 4.4 4.8 5.3 6.0 7.0 7.8 8.4
Entmilzte Kaninchen + Meerschwein-Milzzellen i.v.	3.0 4.3 4.7 5.4 6.0 7.0 7.8 8.5
Entmilzte Kaninchen + Meerschwein - Milz - Lymphozyten, i.v.	3.0 4.3 4.7 5.4 6.2 7.1 7.8 8.7
Entmilzte Kaninchen + Meerschwein - Milz - Granulozyten, i.v.	3.0 4.4 4.8 5.4 6.1 7.0 7.7 8.6
Entmilzte Kaninchen + Kaninchen-Milzzellen i.p.	3.0 4.3 4.7 5.3 6.1 7.1 7.7 8.5

Die weiteren Untersuchungen sollten klären, ob die zur Substitution der entnommenen Milz angebotenen Zellen, die in den entmilzten Kaninchen stets Interferone mit der gleichen Ladungsverteilung stimulieren, dennoch bei einer Induktion in vitro andere Interferone produzieren.

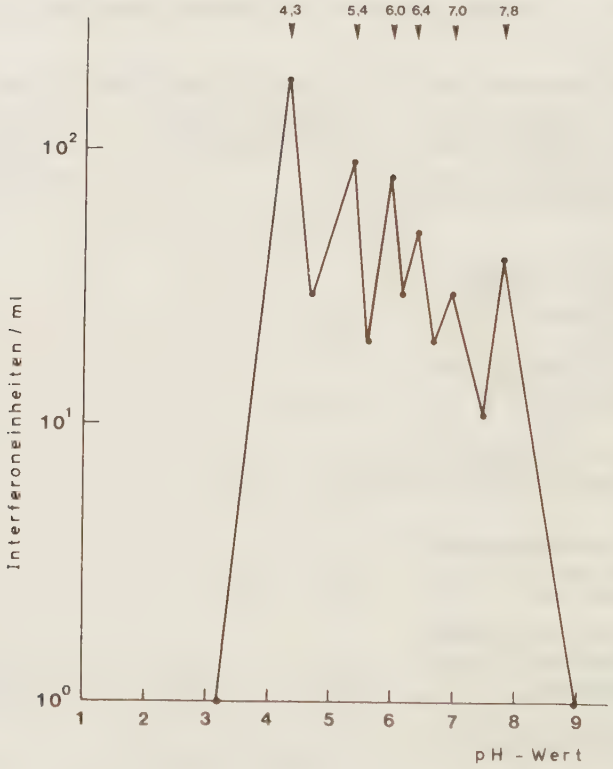


Abbildung 16 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Kaninchen-milz - Interferon.

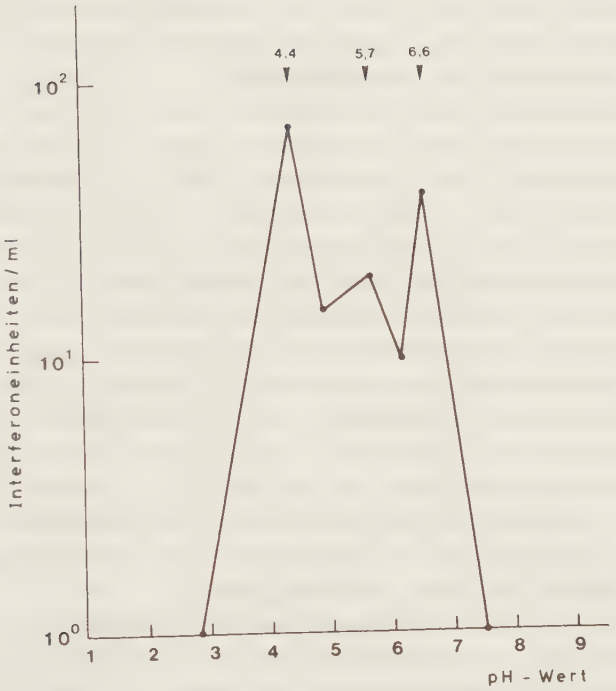


Abbildung 17 : Isoelektrische Fokussierung von Poly IC - induziertem Meerschweinchenmilz - Interferon

Am Beispiel von Kaninchen- und Meerschweinchen-Milz-Interferon konnte also gezeigt werden, daß verschiedene Zellen, die in vitro Interferone mit unterschiedlichen Aktivitätsmustern synthetisieren, als Substituenten einer entnommenen Milz im Organismus jedoch Interferone mit gleicher Ladungsverteilung produzieren.

4. DISKUSSION

Die vergleichenden Interferontiter - Bestimmungen von normalen, entmilzten und scheinoperierten Kaninchen nach Poly IC - Induktion ergaben eine 85 % - ige Reduktion des Interferongehaltes im Serum nach Milzentnahme. Diese Beobachtung bestätigte die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen von DE SOMER und BILLIAU (1966) an Ratten sowie von BORECKY und LACKOVIC (1967) und ITO et.al. (1970) an Mäusen. Alle Autoren stellten übereinstimmend fest, daß der Interferontiter im Serum milzexstirpierter Tiere nach i.v. Stimulierung durch Bakterien (Bordetella pertussis) oder Endotoxine (Escherichia coli) um 70 - 90 % niedriger lag als bei normalen Kontroll - tieren. Auch die Tatsache, daß ' hereditarily asplenic' Mäuse nach Induktion eine signifikant niedrigere Interferonantwort gaben als Normaltiere (LAIR et.al., 1974) spricht dafür, daß das Serum-Interferon - unabhängig von der Art des Induktors und der Tierart - im wesentlichen aus der Milz stammt.

Kaninchen, die nach Milzexstirpation eine gegenüber den normalen Kontrolltieren signifikant erniedrigte Interferonantwort im Serum zeigten, wiesen 6 Tage später eine Erhöhung des Interferontiters um 85 % gegenüber den Kontrollen auf. Bis zum 34. Tag nach Splenektomie sanken die erzielten Serumspiegel wieder auf den Wert normaler Kaninchen ab. Dieser Kurvenverlauf, der durch Reduktion, Überkompensation und ein allmähliches Einpendeln des Serum-Interferon auf den Normalwert charakterisiert ist, deutet darauf hin, daß der Verlust an Interferon - bildenden Milzzellen über einen biologisch wirksamen Regulationsmechanismus von anderen Zellen des Organismus aus - geglichen werden kann (NAIN und KOHLHAGE, 1976).

Da die scheinoperierten Kaninchen nahezu die gleichen Titerwerte im Serum erreichten wie normale Tiere, kann ein Einfluß der Operations - bzw. Narkosebehandlung ausgeschlossen werden.

Die am 1. Tag nach Milzexstirpation verbliebene Restaktivität von 15 % bzw. die nach 5 Wochen wieder erreichte volle Synthesekapazität der entmilzten Kaninchen stammt möglicherweise von Zellen des RES oder des Blutes, wie z.B. aus Leber - und Lungenzellen oder peripheren Blutlymphozyten.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Substitutionsversuche bei entmilzten Kaninchen untersucht, welche Zellen zum Ersatz der entnommenen Milz befähigt sind. Die Befunde zeigen, daß die Kapazität der Interferonsynthese milzexstirpierter Kaninchen durch i.v. Milzzell-Übertragungen völlig kompensiert werden kann, gleichgültig, ob syngenische (Kaninchen-) oder xenogenische (Meerschweinchen -) Milzzellen appliziert werden. Diese Ergebnisse erweitern die Untersuchungen von ITO et.al. (1973), die ähnliche Experimente an entmilzten Mäusen nach Endotoxin - Stimulierung durchgeführt hatten. Auch sie stellten fest, daß eine i.p. Injektion von Milzzellen die Interferon - produzierende Fähigkeit von entmilzten Mäusen kompensiert. LAIR et.al. (1974) erhöhten durch ein neonatales Milzzell-Transplantat die reduzierte Kapazität der Interferonsynthese von ' hereditarily asplenic ' Mäusen. Die neonatale Milzzellgabe versetzte die milzlosen Mäuse in die Lage, annähernd so viel Interferon wie Normaltiere zu produzieren. Über das Schicksal der i.v. injizierten Zellen ist im vorliegenden Fall nichts bekannt, weil die Versuchstiere bereits 2 Stunden nach der Zellüber - tragung mit Poly IC stimuliert und nach weiteren 2 Stunden durch Herzpunktion getötet wurden. Auf Grund dieser kurzen Inkubationszeit entfällt die Möglichkeit einer ' graft versus host reaction '. Andere Arbeitsgruppen (LAIR et.al., 1974; WARGON et.al., 1975) beobachteten, daß Mäuse 2 Monate

nach einer s.c. Gabe von Milzzellen rot pigmentierte Ansammlungen von Milzgewebe im Bereich der Einstichstelle und in ihrer Umgebung aufwiesen.

Das Serum-Interferon, welches in entmilzten Kaninchen nach Übertragung von Meerschweinchen - Milzzellen produziert wurde, besaß die Spezies - Spezifität von Kaninchen - Interferon, d.h. es zeigte seine Aktivität nur in homologen (Kaninchennieren -) Zellkulturen, nicht jedoch auf Zellkulturen von Meerschweinchennieren. Demgegenüber schien Meerschweinchen - Interferon in beiden Zellsystemen mehr oder weniger aktiv zu sein. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die übertragenen Milzzellen nicht selbst die Interferonproduktion übernehmen, sondern möglicherweise nur Induktor - kompetente Zellen darstellen, welche als Transmitter fungieren und die Information an die eigentlichen Interferon - produzierenden Zellen weitergeben. Diese Überlegungen sprechen für einen Mehr - Schritt - Mechanismus der Poly IC - induzierten Interferonsynthese bei Kaninchen.

Beim heterologen Substitutionsversuch durch Mäuse - Milzzellen dagegen wurden keine normalen Seruminterferon - Konzentrationen erreicht. Die Spiegel waren sowohl bei der Austestung auf Kaninchen - Nierenzellen als auch auf L - Zellen größeren Schwankungen unterworfen und ließen keinen Kompensationseffekt erkennen. Dieses Ergebnis könnte - abgesehen von einer fehlerhaften Methodik bei der Behandlung der Mäusezellen - darauf beruhen, daß den Mäusezellen bestimmte ' messenger ' - Eigenschaften der Meerschweinchen - Milzzellen fehlen.

Weitere Versuche wurden angeschlossen, um die Signifikanz dieses Kompensationseffektes durch eine Dosis - Wirkungskurve zu belegen. Im Bereich von 10^2 - 10^8

Zellen ließ sich durch ein Steigerung der transplantierten Zellzahl eine kontinuierliche Erhöhung des Interferonspiegels erzielen. Darüberhinaus blieb eine weitere Wirkungssteigerung aus. Offensichtlich wird mit einer Zellzahl über 10^8 Zellen die Zahl der normalerweise vorhandenen Interferon - kompetenten bzw. Induktor - spezifischen Zellen überschritten, d.h. es stehen für diese unphysiologisch hohe Zellzahl nicht genügend Induktormoleküle zur Verfügung und damit wird, durch ein Mißverhältnis zwischen der applizierten Zellzahl und der konstant gehaltenen Induktormenge das System überlastet.

Nachdem sich der Kompensationseffekt als reproduzierbar und signifikant erwiesen hatte, sollten weiterführende Untersuchungen darüber Auskunft geben, ob Granulozyten oder Lymphozyten den Hauptanteil der Interferonproduzenten stellen. Die mit unterschiedlichen Trennungsmethoden isolierten Lymphozyten waren grundsätzlich aktiver als die Granulozyten. Da die verschiedenen Methoden unterschiedlich effektive Trennungsergebnisse lieferten, wurde der Wirkungsgrad der beiden Zellarten je nach angewandter Methode mehr oder weniger deutlich sichtbar.
Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Kompensationseffekt bei einer i.v. Milzzell - Transplantation (Mischung aus Lymphozyten und Granulozyten) bei entmilzten Kaninchen deutlich höher lag, als bei der separaten Applikation beider Zellarten . Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, daß die transfundierten Lymphozyten die reduzierte Synthesekapazität nur bis zu einem gewissen Grade kompensieren können, während eine intakte Milzzellsuspension, die alle Anteile einer normalen Milz enthält, wirksamer ist. Entweder tritt bei der Zelltrennung eine Schädigung wesentlicher Funktionen der Zellsuspension ein, oder die Zellen sind tatsächlich nur dann, wenn beide Zell-

typen gemeinsam vorliegen, befähigt, den Verlust der Interferon - Synthesekapazität bei entmilzten Kaninchen in vollem Umfange auszugleichen.

ITO et.al. (1973) machten für die kompensierende Wirkung von Milzzellen eindeutig die Glas - adhärenten Zellen (überwiegend Makrophagen) verantwortlich. Andere Autoren (TALAS et.al., 1973; DE MAEYER et.al., 1969, 1971) hielten demgegenüber die Lymphozyten für die eigentlichen Interferon - kompetenten Zellen. So erreichten z.B. immunsuppressiv behandelte Mäuse (Cyclophosphamid oder Antilymphozytenserum) nach Induktion mit Poly IC einen deutlich niedrigeren Interferonspiegel im Serum als Normaltiere (MITROVA, 1973; GUTMANN et.al., 1973), was für eine Beteiligung der Lymphozyten am Interferon-Syntheseprozeß spricht.

TALAS et.al. (1973) beobachteten, daß die Lymphozyten einer Milzzellsuspension aus Poly IC - induzierten Mäusen nach Entfernung der Makrophagen durch Baumwoll - Adsorption allein in der Lage sind, Interferon zu produzieren. Auch DE MAEYER et.al. (1969, 1971) äußerten auf Grund von Untersuchungen mit δ - Bestrahlung oder Antilymphozytenserum die Ansicht, daß periphere Blutlymphozyten maßgeblich an der Interferonproduktion beteiligt sind.

Es existieren jedoch auch Arbeiten, die die Interferon - Synthesefähigkeit nicht einer einzelnen Zellspezies zuordnen, sondern die Interaktion verschiedener Zellen für notwendig erachten. So spricht SOROKIN (1973) Makrophagen und radiosensitiven kleinen Lymphozyten gemeinsam die Fähigkeit zur Interferonsynthese zu. Auch RASMUSSEN et.al. (1974) und BABIUK et.al. (1976) deuteten an, daß eine Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Lymphozyten für eine optimale Interferonproduktion notwendig sei. NAGANO et.al. (1975) vertraten die Auffassung, daß die adhärenten Milzzellen für die Bildung des " frühen " Interferons kompetent seien,

während die nicht adhärenten Zellen die Aufgabe hätten, die " späten " Interferone (24 Stunden nach Induktion) zu synthetisieren. Sie hatten ebenfalls festgestellt, daß die Interferonausbeute aus einer gemischten Kultur von adhärenten und nicht - adhärenten Milzzellen größer ist, als die Summe der Interferone aus separaten Kulturen.
Die widersprüchlichen Meinungen der einzelnen Autoren haben möglicherweise methodische Gründe : d.h. je nach Trennungsqualität der angewandten Methode werden sie eine mehr oder weniger angereicherte Kultur an Lymphozyten bzw. an Granulozyten erzielen, wobei unbeabsichtigte Interaktionen der Zellarten jedoch nie völlig auszuschließen sind. Auch meine Ergebnisse lassen nicht den Schluß zu, daß nur eine Interferon-produzierende Zellart vorliegt, sondern daß verschiedene Zellen in unterschiedlichem Maße am Interferon-Synthesemechanismus beteiligt sind.

Obwohl eine Trennung in T - und B - Lymphozyten nicht eindeutig möglich war, stellte sich heraus, daß diejenige Zellfraktion, die nicht an Nylonwolle adsorbiert wurde und somit - nach Definition - reich an " T - Zellen " war, die höchste Kompensationsfähigkeit zeigte. Auch andere Autoren konnten nachweisen, daß T - Zellen zur Interferonproduktion befähigt sind (MACKENZIE, 1972; STOBO et.al., 1974; VALLE et.al., 1975). In einer gemischten Kultur aus Makrophagen und Lymphozyten entstammte die Hauptmenge des gebildeten Interferons aus T - Lymphozyten. Wurden diese Zellen durch Behandlung mit Anti - theta - Serum eliminiert, so verlor die Kultur den größten Teil ihrer Synthesekapazität. EPSTEIN und AMMAN (1974) benutzten Mitogene als Interferoninduktoren in menschlichen T - und B - Lymphozyten. Die T - Lymphozytenkultur zeigte innerhalb von 3 Tagen antivirale Aktivität, während die Interferonproduktion bei B - Lymphozyten erst nach einer Woche einsetzte.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die T - Lymphozyten nicht nur in vitro zu einer Interferonsynthese befähigt, sondern auch in vivo in der Lage sind, über eine i.v. Zell - Transplantation in entmilzten Kaninchen zu wirken.

Auch hier scheint bei der Verwendung einer gemischten Kultur aus T - und B - Lymphozyten gegenüber den separaten Kulturen ein Verstärkungseffekt in bezug auf die Substitution der entnommenen Milz vorzuliegen. Möglicherweise bedarf die Antwort auf eine Interferoninduktion der Wechselwirkung zwischen mehreren Zelltypen : z.B. einer Glas - adhärenten Zelle, vielleicht eines Makrophagen, eines Thymus - abhängigen T - Lymphozyten sowie eines B - Lymphozyten. Nach BATTISTO (1971) übt die Milz eine regulatorische Funktion auf den Wirkungsmechanismus von T - und B - Lymphozyten aus. Eine Entnahme der Milz könnte demnach auch zu einer Störung der Kooperation von peripheren T - und B - Lymphozyten führen und somit in einer reduzierten Interferon-Synthese resultieren.

Die Zahl verschiedener Effektor - Zellen zeigt, daß die Interferonsynthese nicht ausschließlich in der Milz lokalisiert, sondern auf verschiedene Gewebe des Organismus verteilt ist. Die vermutlich wichtigste regulative Funktion liegt aber im lymphatischen System : erst ein ausgewogenes Verhältnis von T - und B - Lymphozyten sowie von Makrophagen ermöglicht durch die Interaktion eine optimale Reagibilität auf die Induktion und damit eine erfolgreiche Interferonsynthese.

Die Interferon - induzierende bzw. Milz - substituierende Funktion dürfte nicht nur bestimmtem Zellen, sondern innerhalb dieser Zellen auch bestimmten Organellen oder Strukturen zuzuordnen sein. Der Aufschluß der Zellen in einzelne Kompartimente führte jedoch stets zum Verlust der Interferon - Synthese-

fähigkeit. Die Interferonbildung der Zellen bzw. die wirkungsvolle Substitution der entnommenen Milz hat also eine unversehrte Zellstruktur bzw. einen intakten Zellstoffwechsel zur Voraussetzung.

Einen weiteren Aufschluß über den Kompensationsmechanismus bei entmilzten Kaninchen sollte die Variation der Zellapplikationsart geben. Während die splenektomierten Tiere nach einem i.v. Milzzell-Transplantat schon nach 2 Stunden mit gleicher Intensität, d.h. mit nahezu gleichem Interferontiter wie Normaltiere auf eine Interferoninduktion durch Poly IC reagierten, gaben die Kaninchen bei der i.p. Applikation der Zellen erst 24 Stunden nach der Zellgabe eine Interferonantwort auf die Poly IC - Induktion, die jedoch nicht den Serum - Interferontiter normaler Kaninchen erreichte.
ITO et.al. (1971) vermuten, daß bei einer i.p. Applikation des Induktors die Hauptmenge durch peritoneale Makrophagen und durch das Omentum aufgenommen wird. Aus diesem Grund kann man durch eine Omentumektomie die Produktion des zirkulierenden Interferons nach i.p. Gabe des Induktors verhindern.

Variiert man den Zeitraum zwischen der i.v. Milzzellapplikation und der Interferoninduktion durch Poly IC bei entmilzten Kaninchen, so stellt sich heraus, daß ein Mindestzeitraum von 60 Minuten zwischen Zelltransplantation und Induktion liegen muß, damit auch bei splenektomierten Kaninchen die Interferontiter normaler Kontrolltiere erreicht werden können.

Die Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierungen unterstützten ebenfalls die Vermutung, daß die Interferonsynthese einen Mehr - Schritt - Mechanismus zur Voraussetzung hat. Die Seruminterferone entmilzter Kaninchen zeigten nach Substitution durch Milzzellen

junger Kaninchen, unabhängig von der Art und Spezies der Substituenten, immer die gleichen isoelektrischen Aktivitätsmuster.
Injizierte man den entmilzten Kaninchen Zellen, die in vitro befähigt sind, Interferone mit einem bestimmten isoelektrischen Verhaltensmuster zu synthetisieren, so bildeten die splenektomierten Tiere nach Poly IC - Induktion mit Hilfe dieser Zellen ein Kaninchen - eigenes, mit dem von Normaltieren vergleichbares Interferon.
Diese Befunde sprechen dafür, daß die Interferon - produzierenden Zellen (mit der Fähigkeit versehen, Kaninchen - spezifisches Interferon zu bilden) von einer Milzentnahme unbeeinflußt bleiben, während die Induktor - kompetenten Zellen durch Splenektomie entfernt und nachträglich durch eine Zellsubstitution ersetzt werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Frage zu klären, ob auch bei splenektomierten Kaninchen die reduzierte Fähigkeit zur Interferonbildung nach Poly IC - Induktion durch homologe sowie heterologe Substitution von Milzzellen kompensiert werden kann.

Eine vergleichende Titerbestimmung von normalen (n = 25), entmilzten (n = 30) und scheinoperierten Kaninchen (n = 15) zeigte nach Poly IC - Induktion einen um 85 % reduzierten Serum - Interferonspiegel der splenektomierten Tiere im Gegensatz zu Normaltieren ($p \leq 0.001$), während scheinoperierte Kaninchen und Kontrolltiere nahezu den gleichen Serum-Interferontiter aufwiesen ($p \geq 0.9$).

Die verbliebene Interferon - Restaktivität nach Milzexstirpation von 15 % wies darauf hin, daß die Milz zwar den wichtigsten, jedoch nicht den alleinigen Syntheseort für Interferon darstellt. Eine Untersuchung verschiedener Organe des Kaninchens nach Poly IC - Induktion deutete auf eine Beteiligung von Leber, Lunge und Blutleukozyten an der Interferon - produktion splenektomierter Kaninchen hin.

Die homologe Substitution, d.h. die i.v. Übertragung einer Milzzellsuspension 4 - 6 Wochen alter Kaninchen (1×10^8 Milzzellen / Kaninchen ; n = 20) konnte die verlorene Interferon - Synthesekapazität milzexstirpierter Kaninchen völlig ausgleichen : Der Interferontiter von normalen Kaninchen betrug 1230 ± 26.34, der von entmilzten Kaninchen nach i.v. Gabe von homologen Milzzellen 1248 ± 20.17 . Weitere Versuche zeigten, daß auch nach einer heterologen Substitution von Meerschweinchen - Milzzellen (1×10^8 Milzzellen / Kaninchen ; n = 12) die gleichen Serum - Interferontiter wie bei normalen Kontrollkaninchen erreicht wurden (Interferontiter : 1332 ± 198.5 ; $p > 0.05$), während die Substitution der entmilzten Kaninchen durch Mäusemilzzellen (1×10^8 Milzzellen / Kaninchen ; n = 12) ohne Einfluß auf den Interferonspiegel (Titer : 161 ± 20.94) blieb.

Bei Zellkultur - Untersuchungen zeigte das Serum - Interferon entmilzter Kaninchen nach einer Gabe von Meerschweinchen - Milzzellen die Spezies - Spezifität von Kaninchen - Interferon : Das geprüfte Serum - Interferon schützte im Plaque - Reduktionstest nur Kaninchen - , nicht jedoch Meerschweinchenzellen vor einer Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus.

Um den Einfluß der Zellzahl auf die Substitution zu überprüfen, wurden jeweils 4 entmilzten Kaninchen unterschiedliche Zellkonzentrate ($3x10^2$ / $3x10^4$ / $3x10^6$ / $3x10^8$ / $3x10^{10}$ Milzzellen / Kaninchen) 2 Stunden vor Poly IC - Induktion injiziert. Wie diese Dosis - Wirkungskurve erkennen ließ, steht der Kompensationseffekt in einer deutlichen Abhängigkeit von der Zahl der transferierten Zellen. Eine Wirkungs - steigerung ist jedoch nur bis zu einem Sättigungswert von 10^7 i.v. applizierten Milzzellen zu erreichen.

Durch eine Fraktionierung der Milzzellsuspensionen mit Hilfe verschiedener Trennungsmethoden in Lymphozyten und Granulozyten wurde festgestellt, daß die Lymphozyten (Interferontiter : 904 ± 25.75) offensichtlich wirkungsvoller den Verlust der Milz ersetzen als die Granulozyten (Interferontiter : 259 ± 23.85). Dieses Ergebnis konnte durch 2 weitere Zell - Trennungsverfahren bestätigt werden. Ebenso wie die Kaninchen - Milzzellen wurden auch die Milzzellen von Meerschweinchen nach 3 unterschiedlichen Methoden getrennt. Die Lymphozyten erwiesen sich auch hierbei mit einem Interferontiter von 850 ± 50.33 aktiver als die Granulozyten mit einem Titer von 217 ± 20.44 .

Um die zur Kompensation der entnommenen Milz befähigten Lymphozyten noch weiter zu differenzieren, wurde eine Methode angewandt, die unter Eliminierung von B - Zellen zu einer Isolierung der T - Lymphozyten führen soll. Diese T - Lymphozyten erzielten nach Übertragung auf entmilzte Kaninchen ($n = 9$) 52 % des Serum - Interferontiters normaler Kontrollkaninchen.

Die isoelektrische Fokussierung sollte Aufschluß darüber geben, ob sich die einzelnen Interferone von normalen und entmilzten Kaninchen, mit und ohne Substitution durch Milzzellen hinsichtlich ihres Aktivitätsmusters unterscheiden :

Serum - und Milzzell - Interferone normaler Kaninchen zeigten identische Aktivitätsmaxima, was den Schluß zuläßt, daß der Hauptanteil des Serum - Interferons normaler Kaninchen nach Poly IC - Induktion von Milzzellen stammt.

Bei entmilzten Kaninchen traten 3 neue pH - Maxima auf, die auch bei Interferon aus in-vitro - induzierten Blutleukozyten zu beobachten waren.

Die Serum - Interferone entmilzter Kaninchen wiesen nach Substitution durch homologe oder heterologe Milzzellen - unabhängig von Art und Spezies der Substituenten - bei der isoelektrischen Fokussierung stets gleiche, mit Normaltieren vergleichbare Kaninchen - eigene Aktivitätsmuster auf.

6. LITERATUR

AKSENOV, O.A., A.L.TIMKOVSKY, O.N. AGEEVA, E.M.KOGAN S.E. BRESSLER, A.A. SMORODINSTEV, N.S.TIKHOMIROVA SIDOROVA (1973) :
Interferon-inducing and antiviral activities of the double-stranded polyriboguanylic acid - polyribocytidylic acid complex.
Vopr. Virusol. 1973 (3), 345 - 350

ARMSTRONG, D., K. PAUCKER (1966) :
Effect of mycoplasma on interferon production and interferon assay in cell cutures.
J. Bact. 92 , 97 - 101

BABIUK, L.A., B.T. ROUSE (1976) :
Immune interferon production by lymphoid cells : role in the inhibition of herpes - virus.
Infect. Immun. 13 , 1567 - 1578

BARON, S., C.E. BUCKLER (1963) :
Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus.
Science 141 , 1061 - 1063

BATTISTO, J.R., R. BUDMAN, D.R. FREEDMAN (1971) :
' Specificity of fixation loci for homocytotropic antibodies '.
J. exp. Med. 134 , 381

BESANCON, F., H. ANKEL (1974) :
Inhibition of interferon action by plant lectins.
Nature 250 , 784 - 786

BESANCON, F., H. ANKEL (1974) :
Binding of interferon to gangliosides.
Nature 252 , 478 - 480

BESANCON, F., H. ANKEL (1976) :
Specificity and reversibility of interferon ganglioside interaction.
Nature 259 , 576 - 578

BILLIAU, A. (1970) :
The refractory state after induction of interferon with double-stranded RNA.
J. gen. Virol. 7 , 225 - 232

BODO, G., C. JUNGWIRTH (1964) :
Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Hühnerinterferon durch Zonenelektrophorese im Dichtegradienten.
Biochem. Z. 340 , 56 - 59

BORDEN, E.C., E.V. PROCHOWNIK, W.A. CARTER (1975) :
The interferon refractory state II. Biological characterization of a refractoriness-inducing protein.
J. of Immun. 114 , 752 - 756

BORECKY, L., V. LACKOVIC (1967) :
The cellular background of interferon production in vivo. Comparison of interferon induction by Newcastle disease virus and B. pertussis.
Acta virol. 11 , 150 - 158

BORECKY, L., N. FUCHSBERGER, V. HAJNICKA (1974) :
Electrophoretic profiles and activities of human interferon in heterologous cells.
Intervirology 3 , 369 - 377

BREINIG, M.C., J.A. ARMSTRONG, M. HO (1975) :
Rapid onset of hyporesponsiveness to interferon induction on re-exposure to polyribonucleotide.
J. Gen. Virol. 26 , 149 - 158

BUCKLER, C.E., H.G. DUBUY, M.L. JOHNSON, S. BARON (1971) :
Kinetics of serum interferon response in mice after single and multiple injections of Poly I:C.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136 , 394 - 398

BUCKNALL, R.A. (1967) :
' Species - specifity ' of interferons :
a misnomer ?
Nature (Lond.) 216, 1022 - 1023

BURKE, D.C., A. ISAACS (1958) :
Further studies on interferon.
Brit. J. exp. Path. 39 , 78 - 89

BURKE, D.C., A. ISAACS (1958) :
Some factors affecting the production of interferon.
Brit. J. exp. Path. 39 , 452 - 458

BURKE, D.C. (1961) :
The purification of interferon.
Bioch. Vol. 78 , 556 - 563

BURKE, D.C., J. ROSS (1965) :
Molecular weight of chick interferon.
Nature (Lond.) 208 , 1297 - 1299

BURKE, D.C. (1966) :
Mechanisms of interferon production.
in ' Interferons ' (N.B. FINTER ed.) pp. 55 - 86
Amsterdam : North Holland Publ. Co.

CANTELL, K. (1961) :
Production and action of interferon in HeLa cells.
Arch. ges. Virusforsch. 10 , 510 - 521

CANTELL, K., K. PAUCKER (1963) :
Quantitative studies on viral interference in suspended L-cells. IV. Production and assay of interferon.
Virology 21 , 11 - 21

CARTER, W.A., H.B. LEVY (1967) :
Ribosomes : Effect of interferon on their interaction with rapidly labeled cellular and viral RNA's.
Science 155, 1254 - 1257

CARTER, W.A., H.B. LEVY (1968) :
The recognition of viral RNA by mammalian ribosomes. An effect of interferon.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 155, 437 - 443

CASSINGENA, R., C. CHANY, M. VIGNAL, H. SUAREZ, S. ESTRADE, P. LAZAR (1971) :
Use of monkey-mouse hybrid cells for the study of the cellular regulation of interferon production and action.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 68, 580 - 584

COCITO, C., E. DE MAEYER, P. DE SOMER (1962) :
The action of interferon on the synthesis of RNA in fibroblasts infected with RNA.
Life Sci. 1, 753 - 758

COCITO, C., E. DE MAEYER, P. DE SOMER (1962) :
Synthesis of messenger RNA in neoplastic cells treated in vitro with interferon.
Life Sci. 1 , 759 - 764

COLE, B.C., J.C. OVERALL, P.S. LOMBARDI, L.A.GLASGOW (1976) :
Induction of interferon in ovine and human lymphocyte cultures by mycoplasmas.
Infect. Immun. 14 , 88 - 94

DAWSON, D.M., H.M. EPPENBERGER, M.E. EPPENBERGER (1968) :
Multiple molecular forms of creatine kinases.
Ann. NY Acad. Sci. 151 , 616 - 626

DE MAEYER, E., J. DE MAEYER - GUIGNARD, P. JULLIEN (1969) :
Interferon synthesis in X - irradiated animals. III. The high radiosensitivity of myxovirus-induced circulating interferon production.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131 , 36 -41

DE MAEYER - GUIGNARD, J., E. DE MAEYER (1971) :
Effect of antilymphocytic serum on circulating interferon in mice as a function of the inducer.
Nature New Biology 229 , 212 - 214

DE MAEYER - GUIGNARD, J., E. DE MAEYER, L.MONTAGNIER (1972) :
Interferon messenger RNA : Translation in heterologous cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 69 , 1203 - 1207

DESMYTER, J., W.E. STEWART (1976) :
Molecular modification on interferon : Attainment of human interferon in a conformation active on cat cells but inactive on human cells.
Virology 70, 451 - 458

DE SOMER, P., A. PRINZIE, P. DENYS, E. SCHONNE (1962) :
Mechanism of action of interferon. I. Relationship with viral nucleic acid.
Virology 16, 63 - 70

DE SOMER, P., A. BILLIAU (1966) :
Interferon production by the spleen of rats after intravenous injection of Sindbis virus or heat-killed E. coli.
Arch. ges. Virusforsch. 19, 143 - 154

DIANZANI, F., A. PUGLIESE, S. BARON (1974) :
Induction of interferon by nonreplicating single-stranded RNA virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145 , 428 - 433

DIEDERICH, J., E. LODEMANN, A. WACKER (1973) :
Basic dyes as inducers of interferon-like activity in mice.
Arch. ges. Virusforsch. 40 , 82 - 86

DORNER, F., M. SCRIBA, R. WEIL (1973) :
Interferon : evidence for its glycoprotein nature.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 70 , 1981 - 1985

DUBOVI, E.J., T.G. AKERS (1972) :
Interferon induction by Colorado tick fever virus : a double-stranded RNA virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139 , 123 - 127

EAGLE, H. (1959) :
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130 , 432 - 437

ENGLISH, D., B.R. ANDERSEN (1974) :
Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leucocytes on discontinuous density gradients of Ficoll - Hypaque .
J. of Immunol. Methods 5 , 249 - 252

EPSTEIN, L.B., A.J. AMMANN (1974) :
Evaluation of T lymphocyte effector function in immunodeficiency diseases. Abnormality in mitogen-stimulated interferon in patients with selective Ig A deficiency.
J. Immunol. 112 , 617 - 626

ERMOLIEVA, Z.V., L.E. KORNEVA, G.I. BALEZINA, O.V. NIKOLAEVA, J.S. GVAZAVA, L.L. FADEEVA (1973) :
Tilorone as inductor of interferon.
Antibiotiki 18 , 517 - 520

FALCOFF, E., F. FOURNIER, C. CHANY (1966) :
Etude comparative des poids moleculaire de deux interferons humains produit in vitro.
Ann. Inst. Pasteur 111 , 241 - 248

FANTES, K.H. (1966) :
Purification, concentration and physico-chemical properties of interferons.
in ' Interferons ' (N.B. Finter ed.) pp 119 - 180; Amsterdam : North Holland Publ. Co.

FANTES, K.H. (1967) :
Purification of interferon from chick embryonic allantoic fluids and fibroblast tissue infected with influenza virus.
J. Gen. Virol. 1 , 257 - 267

FANTES, K.H., I.G.S. FURMINGER (1967) :
Polyacrylamid gel electrophoresis of highly purified chick interferon.
Nature 216 , 71 - 72

FIELD, A.K., A.A. TYTELL, G.P. LAMPSON, M.R. HILLEMAN (1967) :
Inducers of interferon and host resistance.
II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 58 , 1004

FIELD, A.K., A.A. TYTELL, G.P. LAMPSON, M.R. HILLEMAN (1968) :
Induction of interferon and host resistance in vitro by complexed polynucleotides.
Bact. Proc. 144 - 145

FIELD, A.K., A.A. TYTELL, E. PIPERINO, G.P. LAMPSON, M.M. NEMES, M.R. HILLEMAN (1972) :
Poly I:C, an inducer of interferon and interference against virus infections.
Medicine 51 , 169 - 174

FIELD, A.K., G.P. LAMPSON, A.A. TYTELL, M.R. HILLEMAN (1972) :
Demonstration of double-stranded ribonucleic acid in concentrates of RNA viruses.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141 , 440 - 444

FINDLAY, G.M., F.O. MC CALLUM (1937) :
An interference phenomen in relation to yellow fever and other viruses.
J. Path. Bact. 44 , 405 - 424

FINTER, N.B. (1973) :
Interferon assay methods.
In ' Interferon and Their Inducers ' pp 139 - 142. Ed. by N.B. Finter; New York , American Elsevier.

FINTER, N.B. (1973) :
Interferons and inducers in vivo
I. Antiviral effects in experimental animals.
In ' Interferons and Interferon Inducers '
2 nd edition, pp 295 - 360 ; Ed. by N.B. Finter.
London : North Holland Pub. Co.

FRESHMAN, M.M., T.C. MERIGAN, J.S. REMINGTON, J.E. BROWNLEE (1966) :
In vitro and in vivo antiviral action of an interferon-like substance induced by Toxoplasma gondii.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 , 862 - 866

FRUITSTONE, M.J., B.S. MICHAELS, M. SIGEL, A.C. RUDLOFF (1966) :
Role of the spleen in interferon production in mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122 , 1008 - 1011

GAJDOSOVA, E., J. DOSKOCIL, V. MAYER (1973) :
Dependence of antiviral activity on molecular weight in an interferon stimulator of the natural double-stranded RNA type.
Acta Virol. 17 , 196 - 202

GAJDOSOVA, E., V. MAYER, J. DOSKOCIL (1973) :
Viral infection and resistance in immuno-suppressed host. IV. Abolition of potentiated togavirus A infection by a resistance inducer of the double-stranded RNA type. Failure of an exogenous interferon preparation.
Acta Virol. 17 , 327 - 336

GALABOV, A.S., S.M. GALABOV (1973) :
Interferon induction by detoxicated bacterial endotoxins.
Acta Virol. 17 , 493 - 500

GLASGOW, L.A., K. HABEL (1962) :
The role of interferon in vaccinia virus infection of mouse embryo tissue culture.
J. Exptl. Med. 115 , 503 - 512

GLASGOW, L.A. (1965) :
Leukocytes and interferon in the host response to viral infections. I. Mouse leukocytes and leukocyte-produced interferon in vaccinia virus infection in vitro.
J. Exp. Med. 121 , 1001 - 1018

GLAZ, E.T., M. TALAS (1973) :
Continual serum interferon induced by prolonged drinking of tilorone solution.
Acta Virol. 17 , 168

GLAZ, E.T., E. SZOLGAY, I. STOGER, M. TALAS (1973) :
Antiviral activity and induction of interferon-like substance by quinacrine and acranil.
Antimicrob. Agents Chemother. 3 , 537 - 541

GLAZ, E.T., M. TALAS (1975) :
Comparison of the activity of small molecular Interferon Inducers : Tilorone and Acridine Drugs.
Arch. of Virol. 48 , 375 - 384

GRESSER, I., M.T. BANDU, D. BROUTY - BOYE (1974) :
Interferon and cell division
IX. Interferon-resistant L 1210 cells : characteristics and origin.
J. Natl. Cancer Inst. 52 , 553 - 559

GRESSER, I., M. BANDU, D. BROUTY - BOYE, M. TOVEY (1974) :
Pronounced antiviral activity of human interferon on bovine and porcine cells.
Nature 251 , 543 - 545

GUGGENHEIM, M.A., R.M. FRIEDMAN, A.S. RABSON (1969) :
Interferon action in heterokaryons.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130 , 1242 - 1245

GUTMAN, N.R., A.M. SOROKIN (1973) :
The effect of splenectomy and antilymphocytic serum upon interferon and antibody production.
Vopr. Virusol. 1973 (1), 68 - 73

HALLUM, J.V., J.S. YOUNGNER, W.R. STINEBRING (1965):
Interferon activity asociated with high molecular weight proteins in circulation of mice injected with endotoxin or bacteria.
Virology 27 , 429 - 431

HANKS, J.H. (1948) :
The longevity of chick tissue cultures without removal of medium.
J. cell comp. Physiol. 31 , 235

HELLMANN, W., H. KOHLHAGE (1973) :
Gelchromatographie von virus-induziertem Interferon aus Exsudatgranulozyten.
Arch. ges. Virusforsch. 40 , 128 - 131

HELLMANN, W., H. KOHLHAGE (1973) :
Zelluläre Herkunft der durch Newcastle disease Virus induzierten Serum-Interferonaktivität des Kaninchens.
Arch. ges. Virusforsch. 40 , 334 - 340

HELLMANN, W., H. KOHLHAGE (1973) :
Effects of splenectomy on production of virus induced interferon in rabbits.
Nature New Biol. 241 , 239 - 240

HENLE, W., G. HENLE (1943) :
Interference of inactive virus of Influenza.
Science 98 , 87 - 89

HENLE, W., G. HENLE, F. DEINHARDT, V.V. BERGS (1959) :
Studies on persistent infections in tissue cultures. IV. Evidence for the production of an interferon in MCN-cells by myxoviruses.
J. Exp. Med. 110 , 525 - 541

HO, M., J.F. ENDERS (1959) :
An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 45 , 385 - 389

HO, M., J.F. ENDERS (1959) :
Further studies on the inhibitor of viral activity in infected cell cultures and its role in chronic viral infections.
Virology 9 , 446 - 447

HO, M. (1962) :
Interferon
New Engl. J. Med. 266 , 1285 - 1293; 1313 - 1318; 1367 - 1370

HO, M. (1964) :
Interferon-like virale inhibition in rabbits after intravenous administration of endotoxin.
Science 146 , 1472 - 1474

HO, M., Y. KONO, M.K. BREINIG (1965) :
Tolerance to the induction of interferons by endotoxins and viruses. Role of a humoral factor.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 , 1227 - 1232

HO, M. (1966) :
The production of interferon
in ' Interferons ' (N.B. Finter ed.)
pp 21 - 54

HO, M., Y.H. KE (1970) :
The mechanism of stimulation of interferon
production by a complexed polyribonucleotide.
Virology 40 , 693 - 702

HO, M., Y.H. TAN, J.A. ARMSTRONG (1972) :
Accentuation of production of human interferon
by metabolic inhibitors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139 , 259 - 262

HOPPS, H.E., S. KOHNO, M. KOHNO, J.E. SMADEL (1964):
Production of interferon in tissue cultures
infected with rickettsia tsutsugamushi.
Bact. Proc. 5 , 115

HOSKINS, M. (1935) :
A protective action of neurotropic against
viscerotropic yellow fever virus in Macacus
rhesus.
Americ. J. Tropic. Med. Hyg. 15 , 675 - 680

HUANG, C.H. (1943) :
Titration of St. Louis encephalitis virus and
Jungeblut-Sanders Mouse virus in tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 54 , 158 - 160

HUANG, A.S., R.R. WAGNER (1966) :
Defective T particles of vesicular stomatitis
virus. II. Biological role in homologous inter-
ference.
Virology 30 , 173 - 181

ISAACS, A., J. LINDENMANN (1957) :
Virus interference. I. The interferon.
Proc. roy. Soc. B 147 , 258 - 267

ISAACS, A., J. LINDENMANN, R.C. VALENTINE (1957) :
Virus interference. II. Some properties of
interferon.
Proc. roy. Soc. B 147 , 268 - 273

ISAACS, A., M.A. WESTWOOD (1959) :
Inhibition by interferon of the growth of
vaccinia virus in the rabbit skin.
Lancet 2 , 324 - 325

ISAACS, A., J.S. PORTERFIELD, S. BARON (1961) :
The influence of oxygenation on virus growth.
II. Effect on the antiviral action of interferon.
Virology 14 , 450 - 455

ITO, M., F. SUZUKI (1970) :
Adeno-associated satellite virus growth supported by a temperature-sensitive mutant of human adenovirus.
J. Gen. Virol. 9 , 243 - 245

ITO, Y., A. KUNII, N. MORI, I. NAGATA (1971) :
Effects of splenectomy on production of endotoxin-type interferon in mice.
Virology 44 , 638 - 641

ITO, Y., I. NAGATA, A. KUNII (1973) :
Effects of Omentumectomy on production of endotoxin-type interferon in mice.
Virology 56 , 362 - 364

ITO, Y., I. NAGATA, A. KUNII (1973) :
Mechanism of Endotoxin-type interferon production in mice.
Virol. 52 , 439 - 446

JACOB, F., J. MONOD (1961) :
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J. molec. Biol. 3 , 318 - 356

JOKLIK, W.K., T.C. MERIGAN (1966) :
Concerning the mechanism of action of interferon.
Proc. Nat. Acad. Sci. 56 , 558 - 565

JULIUS, M.H., E. SIMPSON, L.A. HERZENBERG (1973) :
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 3 , 645 - 649

JUNGWIRTH, C., G. BODO (1964) :
Bestimmung des Molekulargewichtes von Interferon durch Gelfiltration.
Biochem. Zeitschrift 339 , 382 - 389

KADRI, A., H. KOHLHAGE (1969) :
Physikalisch-chemische Eigenschaften Myxovirus-induzierter Seruminterferone des Kaninchens.
Arch. ges. Virusforsch. 28 , 51 - 62

KAZAR, J. (1966) :
Interferon-like inhibitor in mouse sera induced by rickettsia.
Acta Virol. 10 , 277

KE, Y.H., M. HO (1966) :
Heterogeneity of rabbit serum interferon.
Nature 211 , 541 - 542

KE, Y.H., J.A. ARMSTRONG, M.K. BREINIG, L. OPLE, B. POSTIC, M. HO (1969) :
The assay and standardization of rabbit interferons.
Symp. Ser. Immunobiol. Standard 14 , 131 - 144

KERR, I.M., A. SONNABEND, E.M. MARTIN (1970) :
Protein-synthetic activity of ribosomes from interferon-treated cells.
J. Virol. 5 , 132 - 144

KLEINSCHMIDT, W.J., J.C. CLINE, E.B. MURPHY (1964):
Interferon production induced by statolon.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 52 , 741 - 744

KLEINSCHMIDT, W.J., E.B. MURPHY (1965) :
Investigations on interferon induced by statolon.
Virology 27 , 484 - 489

KLEINSCHMIDT, W.J., E.B. MURPHY (1967) :
Interferon induction with statolon in the intact animal.
Bact. Rev. 31 , 132 - 137

KLOTZ, I.M., N.R. LANGERMAN, D.W. DARNALL (1970):
Quarternary structure of proteins.
Ann. Rev. Biochem. 39 , 25 - 62

KOHLHAGE, H., R. QUAST (1969) :
Physiko-chemische Charakterisierung von Serum-Interferon nach Induktion von Myxoviren.
Zbl. Bakt. 212

KONO, Y., M. HO (1965) :
The role of the reticuloendothelial System in interferon Formation in the rabbit.
Virology 25 , 162 - 166

KONO, Y. (1967) :
Interferon-like inhibitor produced in bovine leukocyte cultures after inoculation with endotoxin.
Arch. ges. Virusforsch. 21 , 276 - 281

KONO, Y. (1967) :
Rapid production of interferon in Bovine leukocyte cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124 , 155 - 160

KREUZ, L.E., A.H. LEVY (1963) :
Density homogeneity and estimated molecular weight of interferon.
Nature (Lond.) 200 , 883 - 884

LACKOVIC, V., L. BORECKY (1965) :
The reticuloendothelial system and virus infection. II. Production of interferon - and antibody - like substances in mouse peritoneal cells infected with myxoviruses in vitro.
Arch. ges. Virusforsch. 17 , 619 - 630

LAIR, S.V., A. BROWN, B.B. LOZZIO (1974) :
Induction of interferon in hereditarily asplenic mice with and without a neonatal spleen cell transplantat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146 , 457 - 477

LAMPSON, G.P., A.A. TYTELL, M.M. NEMES, M.R.HILLEMAN (1963) :
Purification and characterization of chick embryo interferon.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112 , 468 - 478

LAMPSON, G.P., A.A. TYTELL, M.M. NEMES, M.R.HILLEMAN (1965) :
Characterization of chick embryo interferon induced by a DNA - virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 , 441 - 448

LAMPSON, G.P., A.A. TYTELL, M.M. NEMES, M.R.HILLEMAN (1966) :
Multiple molecular species of interferons of mouse and of rabbit origin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121 , 377 - 384

LENETTE, E.H., H. KOPROWSKI (1946) :
Interference between viruses in tissue culture.
J. Exp. Med. 83 , 195 - 219

LEVY, H.B., J. WHEELER (1973) :
Interferon induction by input virion.
Arch. ges. Virusforsch. 41 , 150 - 153

LEVY, H.B., J. DUENWALD, C.E. BUCKLER (1973) :
Chlorite-oxidized amylose as an adjuvant for interferon production.
Infect. Immun. 7 , 457 - 460

LEVY, H.B., F.L. RILEY (1973) :
Effect of interferon treatment on cellular messenger RNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70 , 3815 - 3819

LEVY, H.B., G. BAER, S. BARON, C.E. BUCKLER, C.J.GIBBS, M.J. IADAROLA, W.T. LONDON, J. RICE (1975) :
A modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex that induces interferon in primates.
J. Infect. Dis. 132 , 434 - 439

LINDENMANN, L., D. BURKE, A. ISAACS (1957) :
Studies on the production, mode of action and properties of interferon.
Brit. J. Path. 38 , 551 - 562

LOCKART, R.Z. (1963) :
Production of an interferon by L-cells infected with western equine encephalomyelitis virus.
J. Bact. 85 , 556 - 566

MACKENZIE, M.R. (1972) :
Variations in interferon production by lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukemia.
J. Clin. Pathol. 25 , 768 - 771

MAEHARA, N., Y. NAGANO (1972) :
Formation of virus-inhibiting factor interferon in splenectomized mice.
Jap. J. Microbiol. 16 , 469 - 474

MAGEE, W.E., S. LEVINE, O.V. MILLER, R.D. HAMILTON (1968) :
Inhibition by interferon of the uncoating of vaccinia virus.
Virology 35 , 505 - 511

MARCUS, P.J., J.M. SALB (1966) :
Molecular basis of interferon action :
Inhibition of viral RNA translation.
Virology 30 , 502 - 516

MARCUS, P.J., J.M. SALB (1968) :
On the translation inhibitory protein (TIP) of interferon action, in
' The Interferons ' (An International Symposium held at the University of Siena, June 5-8,1967)
G. Rita , ed. ; pp 111 - 127. Academic Press.

MARCUS, P.I. (1971) :
Interferon action : Inhibition of VSV RNA Synthesis induced by Virion-bound polymerase.
Science 174 , 593 - 598

MATSUYAMA, M. (1974) :
Cell interaction with poly (rI) . poly (rC) and interferon induction in chick and mouse cells.
J. Gen. Virol. 24 , 503 - 514

MAYER, V., F. SOKOL, J. VILCEK (1961) :
Effect of interferon on the infection with eastern equine encephalomyelitis (EEE) virus and its ribonucleic acid (RNA).
Acta Virol. 5 , 264

MERIGAN, T.C., C.A. WINGET, C.B. DIXON (1965) :
Purification and characterization of vertrebrate interferons.
J. molec. Biol. 13 , 679 - 691

MERIGAN, T.C., W.J. KLEINSCHMIDT (1965) :
Different molecular species of mouse interferon induced by statolon.
Nature 208 , 667 - 669

MERIGAN, T.C., D.F. GREGORY, J.K. PETRALLI (1966) :
Physical properties of human interferon prepared in vitro and in vivo.
Virology 29 , 515 - 522

MERIGAN, T.C. (1969) :
Interferon Scientific Memoranda
Memo Nr. 146 / 1

MITROVA, E., V. MAYER (1973) :
Viral infection and resistance in immuno-suppressed host. II. Stimulatory effect and morphology following a single injection of an interferon inducer of the double-stranded RNA type.
Acta Virol. 17 , 18 - 28

MOZES, L.W., J. VILCEK (1975) :
Distinguishing characteristics of interferon induction with Poly (I) : Poly (C) and Newcastle Disease Virus in human cells.
Virology 65 , 100 - 111

NAGANO, Y., H. KOMATSU (1975) :
Effect of activation of the reticuloendothelial system on formation of virus-inhibiting factor or interferon.
Jap. J. Microbiol. 19 , 228 - 231

NAGANO, Y., N. MAEHARA (1975) :
Role of spleen in formation of virus-inhibiting factor or interferon.
Jap. J. Microbiol. 19 , 232 - 234

NAGANO, Y., N. MAEHARA (1975) :
Virus - inhibiting factor or interferon activity on heterologous animal cells.
Jap. J. Microbiol. 19 , 447 - 448

NAIN, M., H. KOHLHAGE (1976) :
Effects of splenectomy on production of PolyIC induced serum interferon in rabbits.
Arch. Virol. 51 , 151 - 155

NICHOL, F.R., S.D. WEED, G.E. UNDERWOOD (1976) :
Stimulation of murine interferon by a substituted pyrimidine .
Antimicrob. Agents Chemother. 9 , 433 - 439

NOVOKHATSKIJ, A.S., F.I. ERSHOV (1973) :
Refractory phenomenon in the antiviral action of synthetic polynucleotides.
Antibiotiki 18 , 713 - 718

NOVOKHATSKIJ, A.S. (1973) :
Formation of active polynucleotide complexes on the surface of cells.
Vopr. Virusol. 1973 (6), 676 - 682

NOVOKHATSKIJ, A.S., F.I. ERSHOV, E. M. KOGAN, A.L. TIMKOVSKY, S.E. BRESLER, N.S. TIKHOMIROVA-SIDOROVA (1975) :
Double-stranded complex of polyguanylic and polycytidylic acids and its antiviral activity in tissue cultures.
Acta Virol. 19 , 121 - 129

OH, J.O., E.J. GILL (1966) :
Role of interferon-like viral inhibitor in endotoxin induced corneal resistance to Newcastle Disease Virus.
J. Bact. 91 , 251 - 256

O'MALLEY, J.A., Y.K. HO, P. CHAKRABARTI, L.DI BERARDINO, P. CHANDRA, D.A.O. ORINDA, D.M. BYRD, T.J. BARDOS, W.A. CARTER (1975) :
Antiviral activity of partially thiolated polynulceotides.
Mol. Pharmacol. 11 , 61 - 69

ORINDA, D., D. DRAHOVKY, A. WACKER (1972) :
Induction of interferon by polyinosinic-poly cytidylic acid in synchronized mouse L-cells.
Naturwissenschaften 59 , 519 - 520

ORLOVA, T.G., I.I. GEORGADZE, A.I. KOGNOVITSKAYA, V.D. SOLOVYOV (1974) :
Interferon-inducing and interferon-translating functions of RNA isolated from Newcastle diease virus-infected cells.
Acta Virol. 18 , 210 - 216

ORLOVA, T.G., I.I. GEORGADZE, A.I. KOGNOVITSKAYA, V.D. SOLOVYOV (1974) :
Production of messenger RNA for interferon in cells treated with different viruses and poly IC.
Vopr. Virusol. 1974 (4), 431 - 435

ORLOVA, T.G., A.I. KOGNOVITSKAYA, I.I. GEORGADZE, V.D. SOLOVYOV (1976) :
The dynamics of production and the sensitivity to cycloheximide and actinomycin D of interferon-inducing and interferon messenger RNA.
Acta Virol. 20 , 9 - 14

OTTO, F., D.O. SCHMID (1970) :
Lymphozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere.
Blut XXI , 108 - 112

OTTO, F. (1970) :
Granulozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere.
Blut XXI , 290 - 294

PANTELOURIS, E.M., C.R. PRINGLE (1976) :
Interferon production in athymic mice.
J. Gen. Virol. 32 , 149 - 152

PAUCKER, K., B.J. DALTON, C.A. OGBURN, E. TÖRMÄ (1975) :
Multiple active sites on human interferons.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72 , 4587 - 4591

PESTKA, S., J.MC INNES, E.A. HAVELL, J. VILCEK (1975) :
Cell-free synthesis of human interferon.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72 , 3898 - 3901

PITHA, P.M., J. PITHA (1973) :
Interferon induction site : poly IC on solid substrate carrier.
J. Gen. Virol. 21 , 31 - 37

PITHA, P.M., L.W. MARSHALL, W.A. CARTER (1973) :
Interferon : the dissociation of rIn . rCn induced proteins by protonation.
J. Gen. Virol. 21 , 169 - 174

PORTERFIELD, J.S., D.C. BURKE, A.C. ALLISON (1960):
An estimate of the molecular weight of interferon as measured by its rate of diffusion through agar.
Virology 19 , 197 - 203

RAMUZ, M.M., M.C. BOUSQUET, M.J. SASSINE, M.J. ROUX (1974) :
Induction de la synthèse d'interféron chez la souris par des sphéroplastes et des mutant R de Brucella.
C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris, Ser. D. 278 , 1135 - 1137

RASMUSSEN, L.E., G.W. JORDAN, D.A. STEVENS, T.C. MERIGAN (1974) :
Lymphocyte interferon production and transformation after herpes simplex infection in humans.
J. Immunol. 112 , 728 - 736

REMINGTON, J.S., T.C. MERIGAN (1968) :
Protection of cells infected with an intracellular protozoan (Toxoplasma gondii).
Science 161 , 804 - 806

RHOADS, A.R., W.L. WEST, H.P. MORRIS (1973) :
Interferon induction and suppression of solid tumor growth in rats by tilorone hydrochloride.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 6 , 741 - 750

RINALDO, C.R., J.C. OVERALL, B.C. COLE, L.A. GLASGOW (1973) :
Mycoplasma-associated induction of interferon in ovine leukocytes.
Infect. Immun. 8 , 796 - 803

RINALDO, C.R., B.C. COLE, J.C. OVERALL, J.R. WARD L.A. GLASGOW (1974) :
Induction of interferon in ovine leukocytes by species of Mycoplasmas and Acholeplasma.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146 , 613 - 618

RINALDO, C.R., B.C. COLE, J.C. OVERALL (1974) :
Induction of interferon in mice by mycoplasmas.
Infect. Immun. 10 , 1296 - 1301

ROTEM, Z., P.A. CHARLWOOD (1963) :
Molecular weight of interferons from different animal species.
Nature (Lond.) 198 , 1066 - 1068

RYTEL, M.W., T.C. JONES (1966) :
Induction of interferon in mice infected with Toxoplasma gondii.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 , 859 - 862

SAMUEL, C.E., W.K. JOKLIK (1974) :
A protein synthesizing system from interferon-treated cells that discriminates between cellular and viral messenger RNAs.
Virology 58 , 476 - 491

SEGHAL, P.B., I. TAMM, J. VILCEK (1975) :
Human interferon production : superinduction by 5,6-dichloro-1-ß-D-ribofuranosylbenzimidazole.
Science 190 , 282 - 284

SEGHAL, P.B., I. TAMM, J. VILCEK (1976) :
Regulation of human interferon production
I. Superinduction by 5,6-dichloro-1-ß-D-
ribofuranosylbenzimidazole.
Virology 70 , 532 - 544

SELLERS, R.F., K.A.J. HERNIMAN, C.W. HAWKINS (1972):
The effect of a synthetic anionic polymer
(pyran) on the development of foot and mouth
disease in guinea-pigs, cattle and pigs.
Res. Vet. Sci. 13 , 339 - 341

SIEGERT, R., H.L. SHU, H. KOHLHAGE (1967) :
Correlation between fever and interferon titer
in rabbits after induction with myxoviruses.
Life Sci. 6 , 615 - 620

SIEGERT, R., W. POLLMANN, H.L. SHU (1967) :
Zur chemischen Natur des endogenen, durch
Myxoviren induzierten Pyrogens.
Z. Naturforsch. 22 , 320 - 323

SMITH, T.C., R.R. WAGNER (1967) :
Rabbit macrophage interferons. I. Conditions
for biosynthesis by virus infected and uninfec-
ted cells.
J. Exp. Med. 125 , 559 - 577

SMITH, T.J., R.R. WAGNER (1967) :
Rabbit macrophage interferons. II. Some
physico-chemical properties and estimations
of molecular weight.
J. Exp. Med. 125 , 579 - 593

SMITH, T.J., A.S. LUBINIECKI, J.A. ARMSTRONG,
S.B. RUSS (1973) :
Interferon induced by endotoxin and Newcastle
disease virus in rabbit macrophage and kidney
cell cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 , 481 - 486

SONNABEND, J.A., E.M. MARTIN, E.MECS, K.H. FANTES
(1967) :
The effect of interferon on the synthesis and
activity of an RNA polymerase isolated from chick
cells infected with Semliki forest virus.
J. Gen. Virol. 1 , 41 - 48

SONNABEND, J.A., E. MARTIN, E. MECS (1967) :
Viral RNA components appearing in chick cells
infected with Semliki forest virus.
Nature (Lond.) 213 , 365 - 367

SOROKIN, A.M. (1973) :
The effect of roentgen rays and imuran on the
interferon and antibody production.
Vopr. Virusol. 1973 (4) , 443 - 446

STINEBRING, W.R., G.S. YOUNGNER (1964) :
Patterns of interferon appearance in mice injected with bacterial endotoxin.
Nature 204 , 712

STINEBRING, W.R., J. YOUNGNER (1965) :
Appearance of viral inhibitor in circulation of mice injected intravenously with Mycoplasma pneumoniae.
zitiert in BORECKY, L., V. LACKOVIC (1967),
Acta Virol. 11 , 150 - 158

STOBO, J., I. GREEN, L. JACKSON, S. BARON (1974):
Identification of a subpopulation of mouse lymphoid cells required for interferon production after stimulation with mitogens.
J. Immunol. 112 , 1589 - 1593

STRANDER, H., K. CANTELL (1966) :
Production of interferon by human leukocytes in vitro.
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 44 , 265 - 273

STRINGFELLOW, D.A., J.C. OVERALL, L.A. GLASGOW (1974) :
Interferon inducers in therapy of infection with encephalomyocarditis virus in mice.
I. Effect of single doses of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid and tilorone hydrochloride on viral pathogenesis.
J. Infect. Dis. 130 , 470 - 480

STRINGFELLOW, D.A., J.C. OVERALL, L.A. GLASGOW (1974) :
Interferon inducers in therapy of infection with encephalomyocarditis virus in mice.
II. Effect of multiple doses of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid on viral pathogenesis.
J. Infect. Dis. 130 , 481 - 488

STRINGFELLOW, D.A. (1975) :
Hyporeactivity to interferon induction : characterization of a hyporeactive factor in the serum of encephalomyocarditis virus-infected mice.
Infect. Immun. 11 , 294 - 302

SUZUKI, S., M. SUZUKI, M. IMAYA, F. CHAKI (1972):
Interferon-inducing activity of acidic polysaccharides. II. Induction of rabbit serum interferon by chemically phosphorylated polysaccharides.
Jap. J. Microbiol. 16 , 1 - 5

SUZUKI, F., T. SUGANUMA, N. ISHIDA (1974) :
Interferon induction by an antitumor antibiotic, Lymphomycin.
J. Antibiot. 27 , 346 - 348

SUZUKI, F., N. ISHIDA, M. SUZUKI, T. SATO, S. SUZUKI (1975) :
Effect of interferon inducer, dextran phosphat, on Influenza virus infection in mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149 , 1069 - 1075

SVEC, J., P. SVEC (1974) :
On the mechanism of interferon induction by polynucleotides: suppressive effect of poly (rI) . poly (rC) on the liberation of histamine by polycations.
Arch. ges. Virusforsch. 44 , 307 - 312

SVENSSON, H. (1961) :
Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH-gradients. I. The differential equation of solute concentration at a steady state and its solution for simple cases.
Acta chem. Scand. 15 , 325 - 341

SVET-MOLDAVSKY, G.J., B.M. NEMIROVSKAYA, T.V.OSIPOVA, E.G. SLAVINA, S.N. ZINZAR, N.V. KARMANOVA, L.F. MOROZOVA (1974) :
Interferonogenicity of antigens and ' early ' cytotoxicity of lymphocytes.
Folia. Biol. 20 , 225 - 230

SVET-MOLDAVSKY, G.J., B.M. NEMIROVSKAYA, T.V.OSIPOVA (1974) :
Interferonogenicity and antigen recognition.
Nature 247 , 205 - 206

TABORSKY, I., H. KOHLHAGE, R. SIEGERT (1970) :
Cellular origin of different interferons of rabbit serum after induction with NDV or IC-copolymer.
Resumen, Mexico, D.F. 9 - 15 VIII, 1970

TABORSKY, I. (1974) :
Heterogeneity of rabbit serum interferon induced by poly IC.
Arch. ges. Virusforsch. 44 , 51 - 57

TABORSKY, I. (1974) :
Electrofocusing of interferons induced by poly IC in the serum and peritoneal exsudate granulocytes of rabbits.
Arch. ges. Virusforsch. 44 , 58 - 61

TAKEHARA, M., N. SUZUKI (1973) :
Interferon induction by rice dwarf virus RNA : antiviral activity in vitro and its stability.
Arch. ges Virusforsch. 40 , 291 - 299

TALAS, M., I. KONSTANTINOVA, B.B. FUKS, I. STÖGER, E. SZOLGAY (1973) :
Interferon, nucleic acid and protein synthesis in mouse spleen cells after acute γ - irradiation.
J. Gen. Virol. 18 , 393 - 397

TAN, Y.H., J.A.ARMSTRONG, M. HO (1971) :
Accentuation of interferon production by metabolic inhibitors and its dependence on protein synthesis.
Virology 44 , 503 - 509

TAYLOR, J. (1965) :
Studies on the mechanism of action of interferon. I. Interferon action and RNA synthesis in chick embryo fibroblasts infected with Semliki forest virus.
Virology 25 , 340 - 349

TAZULAKHOVA, E.B., A.S. NOVOKHATSKIJ, F.I. YERSHOV (1973) :
Interferon induction by, and antiviral effect of poly (rI).poly (rC) in experimental viral infection.
Acta Virol. 17 , 487 - 492

THORSBY, E. (1967) :
Vox. sanguinis 13 , 194
zitiert in ENGLISH, D., B.R. ANDERSEN (1974)
J. Immunol. Methods 5 , 249 - 252

TYRELL, T.A.J. (1959) :
Interferons produced by cultures of calf kidney cells.
Nature (Lond.) 184 , 452 - 453

VALLE, M.J., G.W. JORDAN, S. HAAHR, T.C. MERIGAN (1975) :
Characteristics of immune interferon produced by human lymphocytes compared to other human interferons.
J. Immunol. 115 , 230 - 233

VALLE, M.J., A.M. BOBROVE, S. STROBER, T.C. MERIGAN (1975) :
Immune specific production of interferon by human T cells in combined macrophage-lymphocyte cultures in response to herpes simplex antigenes.
J. of Immunol. 114 , 435 - 441

VENGRIS, V.E. (1976) :
Interferon action: Role of membrane gangliosides.
Virology 72 , 486 - 493

VILCEK, J., J.H. FREER (1966) :
Inhibition of Sindbis virus plaque formation by extracts of E. coli.
J. Bact. 92 , 1716 - 1722

VILCEK, J. (1969) :
Interferon
Virology monographs

VILCEK, J., E.A. HAVELL, M. KOHASE (1976) :
Superinduction of interferon with metabolic inhibitors : possible mechanisms and practical applications.
J. Infect. Dis. 133 , Suppl. A 22 - 29

WADDEL, G.H. (1962) :
Ph. D. Thesis, University of Miami

WAGNER, R.R. (1960) :
Viral interference. Some considerations of basic mechanisms and their potential relationship to host resistance.
Bact. Rev. 24 , 151 - 166

WAGNER, R.R. (1961) :
Biological studies of interferon.
I. Suppression of cellular infection with Eastern equine encephalomyelitis virus.
Virology 13 , 323 - 337

WAGNER, R.R., T.A. SCHNAITMAN, R.M. SNYDER (1968):
Structural proteins of vesicular stomatitis virus.
J. Virol. 3 , 395 - 403

WARGON, L.B., B.B. LOZZIO, C.J. WUST (1975) :
Alteration of bone marrow-thymus cell synergism in hereditarily asplenic and adult splenectomized mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148 , 925 - 928

WHEELOCK, E.F. (1965) :
Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin.
Science 149 , 310 - 311

WHEELOCK, E.F., R. EDELMAN (1969) :
Specific role of each human leukocyte type in viral infections.
III. 17 D yellow fever virus replication and interferon production in homogenous leukocyte cultures treated with phytohemagglutinin.
J. Immunol. 103 , 429 - 436

YOUNGNER, J.S., W.R. STINEBRING (1964) :
Interferon production in chickens injected with Brucella abortus.
Science 144 , 1022 - 1023

YOUNGNER, J.S., W.R. STINEBRING (1965) :
Interferon appearance stimulated by endotoxin, bacteria, or viruses in mice pretreated with E. coli endotoxin or infected with Mycobacterium tuberculosis.
Nature (Lond.) 208 , 456 - 458

YOUNGNER, J.S., W.R. STINEBRING, S.E. TAUBE (1965):
Influence of inhibitors of protein synthesis on interferon formation in mice.
Virology 27 , 541 - 550

YOUNGNER, J.S. (1968) :
Interferon production in mice injected with viral and non-viral stimuli.
in ' Medical and applied Virology '
(M. Sanders and E.H. Lenette, eds.) pp 210 - 222 ; St. Louis: W.H. Green

YOUNGNER, J.S., G. KELETI, D.S. FEINGOLD (1974) :
Antiviral activity of an ether-extracted non-viable preparation of Brucella abortus.
Infect. Immun. 10 , 1202 - 1206

ZEMLA, J., J. VILCEK (1961) :
Studies on an interferon from tick-born encephalitis virus infected cells .
II. Physical and chemical properties of IF.
Acta Virol. 5 , 367 - 372

Vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Kohlhage für die Themenstellung sowie Betreuung und Förderung der Arbeit, Herrn Prof.Dr, R. Siegert für seine Unterstützung und anregenden Diskussionen, sowie Herrn Prof.Dr. E. Geyer für seine Bereitschaft danken, das Hauptgutachten zu übernehmen.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau H. Heipel - Menzel für ihre stete Hilfsbereitschaft, sowie Herrn H. Vincon und Herrn F. Brandl für die technische Mithilfe bei der Durchführung einiger Experimente.

LEBENSLAUF

23. August 1949	Geboren als Tochter des Postfacharbeiters Josef Friedrich Nain und seiner Ehefrau Maria Nain, geb. Pickl in Marburg
1956 - 1960	Besuch der Volksschule (Otto-Ubbelohde-schule) in Marburg
1960 - 1968	Besuch der Elisabethschule (neusprach-liches Gymnasium für Mädchen) in Marburg
Juni 1968	Reifeprüfung
WS 68/69 - SS 72	Studium der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg
Februar 1974	Diplom-Hauptprüfung mit einer experimen-tellen Arbeit über : " Die Bedeutung der Milz für die Produktion des Serum-Interferon beim Kaninchen nach Induktion durch Poly IC."
seit 1. Januar 1977	Wissenschaftliche Angestellte im Hygiene-Institut der Philipps-Universität Marburg. Gleichzeitig, unter Anleitung von Prof. Dr. H. Kohlhage, Vorbereitung auf die Promotion.

Meine akademischen Lehrer waren :

Bergmann, Bommer, Buchholtz, Bürger, Cleffmann,
Dehnicke, Dimroth, Fischer, Geyer, Henssen,
Kessel, Koch, Koecke, Kohlhage, Lenski, Ludwig,
Lüdtke, Mannheim, Nöth, Nultsch, Oepen, Pfeil,
Remane, Schiff, Schmidt, Scriba, Seitz, Senger,
Siegert, v. Stosch, Walcher, Witzel, Zimmermann